

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio acerca de la tuberculosis del olivo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Esteban García de los Ríos

Madrid, 2015

D 581.2
GAR
est

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología

BIBLIOTECA UCM



5300154621

ESTUDIO ACERCA DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO



José Esteban García de los Ríos

Madrid, 1989

R. 13.250

Colección Tesis Doctorales. N.º 207/89

na x-53-018430-2

© José Esteban García de los Ríos

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria
Madrid, 1989
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-26499-1989

FACULTAD DE BIOLOGIA
Departamento de Microbiología
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

ESTUDIOS ACERCA DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO

Memoria presentada por José Esteban García de los Ríos
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Dirigida por el Profesor Dr. D. Dimas Fernández-
Galiano Fernández, Catedrático y Profesor Emérito de
Microbiología.

MADRID, 1988

VISTO BUENO DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL PROFESOR DR. D.
DIMAS FERNANDEZ-GALIANO FERNANDEZ, CATEDRATICO Y PROFESOR
EMERITO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

EL DIRECTOR

Fdo.: Dimas Fernández-Galiano Fernández

EL AUTOR

Fdo.: José E. García de los Ríos

A Esmeralda, Daniel y Pepe.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

AIA: Acido indol 3-acético.
APHA: American Public Health Association.
FDA: Food and Drug Administration.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
HPLC: High Performance Liquid Chromatography.
IgG: Inmunoglobulina G.
INA: Ice Nucleation Active.
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
PBS: Phosphate Buffered Saline.
PDB: Potato Dextrose Broth.
SEM: Sociedad Española de Microbiología.
SR: Siringomicina.
TBA: Alcohol butílico terciario.

Antibióticos (según denominaciones comerciales):

AM: Ampicilina.
CR: Cefalotina.
SD: Sulfadiazina.
SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim.



INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
1. EL OLIVO: GENERALIDADES	1
1.1. Biología del olivo	2
1.1.1. Caracteres generales	2
1.1.2. Sistema radicular	3
1.1.3. Organos aéreos	3
1.1.3.1. El tronco	3
1.1.3.2. Las ramas principales	4
1.1.3.3. La vegetación	4
1.1.4. Las inflorescencias y las flores	5
1.1.5. El fruto	6
2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL OLIVO	6
2.1. Distribución a nivel mundial	6
2.2. Distribución en la cuenca mediterránea	8
2.3. Distribucion en España	9
3. VARIEDADES DEL OLIVO	11
4. ENFERMEDADES PARASITARIAS DEL OLIVO	13
4.1. La mosca del olivo (<i>Dacus oleae</i> . Gmel)	16
4.1.1. Ciclo biológico de <i>Dacus oleae</i> . Gmel	18
4.2. La polilla del olivo (<i>Prays oleae</i> . Bern)	21
4.2.1. Ciclo biológico de <i>Prays oleae</i> . Bern	22
4.3. La cochinilla negra (<i>Saissetia oleae</i> . Bern)	25
4.3.1. Ciclo biológico de <i>Saissetia oleae</i> . Bern	26

4.4. El barrenillo del olivo (<i>Phloeotribus scarabeoides</i>)	27
4.4.1. Ciclo biológico de <i>Phloeotribus scarabeoides</i>	29
5. LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO	30
5.1. Histología del tumor	32
5.2. Agente etiológico: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	34
5.2.1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> como epífita	41
5.2.2. Presencia de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> en el suelo	48
5.2.3. Relación de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> con insectos	49
5.2.4. Relación de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> con otras bacterias	51
5.2.5. Relación de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> con las heladas	53
5.3. Factores de patogeneidad y virulencia	57
5.3.1. Producción de auxinas	57
5.3.2. Producción de fitotoxinas	66
5.3.3. Producción de citoquininas	73
5.4. Importancia económica de la enfermedad	75
II. OBJETIVOS DEL TRABAJO	77

III. MATERIALES Y METODOS	79
1. MATERIALES	79
1.1. La zona olivarera 6 o Centro	79
1.2. La comarca de Navahermosa	79
1.3. Cepas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	85
1.4. Cepas de otras bacterias asociadas a la tubercu- losis del olivo	87
1.5. Plantas empleadas para pruebas de patogeneidad	88
1.6. Medios de cultivo	88
1.6.1. Medios para el aislamiento de bacterias	88
1.6.2. Medios de cultivo para antibiogramas	92
1.6.3. Medios de cultivo para mohos y levaduras	93
1.6.4. Medios de cultivo para la identificación y caracterización de bacterias	94
1.6.5. Medios de cultivo para el recuento de microorganismos	111
1.6.6. Medios de cultivo para la producción de AIA y/o siringomicina	112
2. METODOS	114
2.1. Aislamiento de bacterias de la flora asociada a los tumores	114
2.2. Producción de anticuerpos para la identifica- ción rápida de bacterias	115
2.2.1. Purificación de las IgG	117
2.2.2. Comprobación de la pureza de las IgG por electroforesis	118

2.2.3. Almacenamiento de las IgG	120
2.2.4. Marcaje de Anticuerpos con Fluoresceina	121
2.3. Análisis cuantitativo de la flora epifítica del olivo	122
2.4. Recuento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> en la flora epifítica del olivo	124
2.5. Análisis cualitativo de la flora epifítica y de la flora asociada a los tumores	125
2.5.1. Reacciones de aglutinación	126
2.5.2. Pruebas bioquímicas	127
2.5.3. Antibiógramas	127
2.5.4. Capacidad criogénica	129
2.6. Estudio de la transmisión de la tuberculosis del olivo durante la recolección de la aceituna	129
2.7. Asociación de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> y otra flora tumoral a la mosca del olivo	131
2.8. Observaciones microscópicas de los tumores	132
2.8.1. Cortes con microtomo de congelación	132
2.8.2. Inclusión y cortes de microtomo de parafina	133
2.8.3. Microscopía de fluorescencia	134
2.8.4. Microscopía electrónica	135
2.9. Producción de ácido indol 3-acético	138
2.9.1. Estimación colorimétrica (Método de Gordon y Weber, 1951)	138
2.9.2. Detección de AIA por HPLC	140
2.10. Producción de siringomicina	150

2.10.1. Métodos de Gross y De Vay (1976, 1977 1985) modificados	150
2.10.2. Detección de siringomicina por HPLC	153
IV. RESULTADOS	156
1. ESTUDIO CUALITATIVO DE LA FLORA BACTERIANA ASOCIA- DA A LOS TUMORES	156
1.1. Flora bacteriana asociada a tumores en <i>Olea europaea</i>	156
1.2. Flora bacteriana asociada a tumores en otras plantas sensibles a <i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. savastanoi</i>	170
1.3. Análisis de la variabilidad de <i>P. syringae</i>	174
1.4. Análisis de la variabilidad de otras bacterias presentes en la flora tumoral	179
2. PRESENCIA DE LA FLORA BACTERIANA ASOCIADA A LOS TUMORES EN LOS PARASITOS DEL OLIVO	186
2.1. Obtención de cultivos	192
2.2. Observaciones microscópicas	193
3. POSIBLE TRANSMISION DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO EN LA RECOLECCION	194
3.1. Obtención de cultivos y observaciones micros- cópicas	194
3.2. Observaciones de campo	196
4. VARIACIONES ESTACIONALES DE LA FLORA EPIFITICA DEL OLIVO	197

4.1. Recuento de microorganismo totales	197
4.2. Recuento de <i>P. syringae</i>	200
5. ANATOMIA, HISTOLOGIA Y CITOLOGIA DE LOS TUMORES INDUCIDOS ESPONTANEA O EXPERIMENTALMENTE POR <i>P.</i> <i>SYRINGAE</i> PV. <i>SAVASTANOI</i>	203
5.1. Observaciones a nivel macroscópico	203
5.2. Observaciones microscópicas	211
5.2.1. Histología de tumores de rama de olivo	211
5.2.2. Histología de tumores de hoja de olivo	220
5.2.3. Histología de tumores de <i>Retama sphae-</i> <i>rocarpa</i>	224
6. PRODUCCION DE AIA	229
6.1. Método de Gordon y Weber	229
6.2. Cromatografía líquida (HPLC)	237
7. PRODUCCION DE SIRINGOMICINA	267
7.1. Análisis cualitativo	267
7.2. Estudio del rendimiento en el proceso de purificación de siringomicina	272
7.3. Análisis cuantitativo	273
7.4. Producción de fitotoxina en los tejidos infectados	284
V. DISCUSION	287
1. SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN LOS TUMORES	287
2. VARIABILIDAD DE <i>P. SYRINGAE</i> PV. <i>SAVASTANOI</i>	289
2.1. Variabilidad de cepas de <i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> procedentes de <i>Olea europaea</i>	290

2.2. Variabilidad de cepas de <i>P. syringae</i> pv.	
savastanoi procedentes de otras plantas	294
3. VARIABILIDAD DE LAS ENTEROBACTERIACEAE PRESENTES	
EN LA FLORA TUMORAL	298
4. VARIACIONES NUMERICAS DE LA FLORA EPIFITICA	303
5. AGENTES DE TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD	307
5.1. Relación con la mosca de olivo	307
5.2. Relación con la recolección	308
5.3. Relación con las heladas	308
6. CITOLOGIA E HISTOLOGIA DE LOS TUMORES	309
7. PRODUCCION DE AIA	309
7.1. Evaluación de métodos	309
7.2. Cinética de la producción de AIA	310
8. PRODUCCION DE SIRINGOMICINA	315
VI. CONCLUSIONES	318
VII. BIBLIOGRAFIA	319

El presente trabajo ha sido realizado casi exclusivamente en los laboratorios del Colegio Universitario San Pablo (C.E.U.)

En primer lugar he de hacer constar mi agradecimiento al Dr. D. Dimas Fernández-Galiano Fernández, Profesor Emérito y Catedrático de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense, por la dirección del trabajo y por la confianza depositada en mí, teniendo en cuenta que la investigación se ha desarrollado en un laboratorio diferente al suyo.

A Carmen Ascaso, del Instituto de Edafología y Biología Vegetal del C.S.I.C. y a su auxiliar, María José Villoslada, por su valiosa ayuda en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica.

A R. Beltrá, C. Ramirez y E. Alonso, del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C., que me proporcionaron algunos de los microorganismos empleados.

Al fallecido Dr. C. Sánchez Botija, del I.N.I.A., por su orientación en las técnicas de Inmunofluorescencia.

A mis compañeros de los laboratorios, así como al personal no docente del Colegio Universitario San Pablo, especialmente aquellos que han colaborado más directamente en este trabajo.

I. INTRODUCCION

Olivares, Dios os dé
los eneros
de aguaceros,
los agostos de agua al pie,
los vientos primaverales,
vuestras flores racimadas;
y las lluvias otoñales
vuestras olivas moradas.

Antonio Machado (Los Olivos).

I. INTRODUCCION.

1. EL OLIVO: GENERALIDADES.

El olivo (*Olea europaea* L.), árbol de procedencia mediterránea, perteneciente a la familia Oleaceae, dentro del orden Oleales (Tutin, T.G. 1972), que se caracteriza por la robustez de su porte y sus hojas sencillas de un gris plateado; produce drupas (las olivas o aceitunas), de mesocarpio y endosperma ricos en aceite.

El origen del olivo, como planta cultivada, es muy antiguo, compartiendo con la vid las primeras referencias en las crónicas de los pueblos más antiguos y es objeto de leyendas mitológicas.

De Candolle postula que esta planta es originaria de Siria, mientras que Pelletier supone que su origen es Asia Menor y que fué traída a Europa por los focenos cuando fundaron su colonia en Francia. Otros autores sostienen que su introducción fué realizada por los fenicios en los tiempos prehelénicos, e

incluso algunos piensan que se remontan al siglo VII (a. de C.) durante Numa Pompilius, segundo rey legendario de Roma (Lousert, R. y Brousse, G. 1980). Lo que si parece deducirse como cierto de todas las hipótesis y leyendas, es que la expansión del cultivo del olivo se produjo de Oriente a Occidente y se extendió por toda la cuenca del Mediterráneo.

1.1. Biología del Olivo.

1.1.1. Caracteres generales.

El olivo se diferencia de otras especies frutales por su gran longevidad, conociéndose árboles de varios centenares de años. Cuando desaparece el tronco por envejecimiento, los brotes que surgen de su base (chupones) se desarrollan, dando un nuevo árbol y asegurando su supervivencia.

Otra característica del olivo es su gran robustez, siendo posible su desarrollo y fructificación en climas áridos y en suelos muy pobres. Naturalmente, en estas condiciones su producción es muy pequeña.

La entrada en producción del olivo puede oscilar desde los cuatro a cinco años hasta los diez o quince, según las condiciones ambientales.

El desarrollo que puede alcanzar, si no se poda, llega a los 15-20 m. de altura; aunque en las condiciones normales de cultivo, con sus podas periódicas, se limita la altura, como máximo de 4-5 m. Esta limitación de altura se aprovecha en favor de una mayor frondosidad sobre un diámetro hasta de 8-10 m.

El olivo se multiplica fácilmente por vía vegetativa,

bien sea a partir de estacas procedentes de las ramas, o bien partir de unas excrecencias (zuecas) situadas en la base del tronco. De esta forma se ha conseguido que su cultivo se mantenga en el curso de los siglos.

1.1.2. Sistema radicular.

El desarrollo del sistema radicular del árbol depende principalmente de las características físico-químicas y estructurales del suelo, adaptándose a la profundidad del terreno y siguiendo su textura y estructura.

Cuando el olivo se injerta in situ, a partir de una semilla sin que haya habido transplante, el sistema radicular de la planta será pivotante y, si lo permiten las condiciones del suelo, se desarrollan dos o tres raíces en profundidad. Posteriormente aparece una red de raíces secundarias en forma de cabellera y con tendencia rastrera.

Las plantas producidas a partir de estacas desarrollan un sistema radicular esencialmente fasciculado que se adaptará a las condiciones del suelo.

1.1.3. Organos aéreos

Los órganos aéreos del árbol son el tronco, las ramas principales y la vegetación.

1.1.3.1. El tronco.

En los árboles jóvenes el tronco es recto y circular, sin grandes irregularidades, pero a medida que envejece se deforma, ennegrece y se retuerce.

En determinadas zonas, como en Andalucía, se construyen

olivos con tres o cuatro pies, que se pueden conseguir sembrando tres o cuatro estacas originalmente, o bien, en las viejas plantaciones, proceden de las zuecas de la base del tronco.

1.1.3.2. Las ramas principales.

Las ramas principales son las gruesas ramificaciones que constituyen el armazón aéreo del árbol.

Idealmente deben ser de tres a cinco las ramas principales que se seleccionen en las primeras podas. Si su número es muy elevado la iluminación de la copa será insuficiente, con el consiguiente perjuicio para el árbol.

1.1.3.3. La vegetación.

La vegetación está constituida, principalmente, por el conjunto de ramas con hojas y frutos.

Las hojas del olivo son perennes, pudiendo durar hasta tres años. Son sencillas, enteras, sin estípulas y con un corto peciolo. El limbo es lanceolado terminando en punta y únicamente el nervio central es aparente. La disposición de las hojas es opuesta en el ramo, característica de la familia Oleaceae.

El haz de las hojas es brillante, coriáceo y de color verde oscuro, mientras que el envés tiene un aspecto plateado debido a la presencia de tricomas en forma de escama (Esau, K. 1967). La forma y dimensiones de las hojas difiere mucho de una variedad a otra.

La anatomía del limbo de una hoja comprende:

- Una epidermis del haz muy cutinizada.
- Un parénquima en empalizada en dos o tres capas.

- Un parénquima lagunar con intersticios.
- Elementos conductores a nivel del nervio medio: un haz libero-leñoso asociado a elementos de sostén, esclerénquima y colénquima.
- Una epidermis del envés con estomas recubiertos de tricomas. (Metcalfe y Chalk, 1972).

Los brotes que se desarrollan durante la primavera y el otoño del año precedente son los que producirán flores y, más tarde, frutos.

1.1.4. Las inflorescencias y las flores.

Las inflorescencias están constituidas por racimos largos y flexibles, con 4-6 ramificaciones secundarias. El número de flores es muy diverso según la variedad.

La pequeña flor responde a las siguientes características:

- Cuatro sépalos, cuatro pétalos, dos estambres y dos carpelos.
- Los sépalos forman un cáliz persistente con cuatro divisiones poco profundas (gamosépalo).
- La corola está formada por pétalos soldados (gamopétala) y es unas tres veces más ancha que el cáliz. Los pétalos son de un color blanco amarillento.
- Los dos estambres, opuestos, están insertos en la corola por un hilo corto. Las anteras están rodeadas por dos celdas que encierran el polen.
- Los dos carpelos están soldados en un ovario libre,

bilocular, con dos óvulos anátropos por celda en placentación axilar. El estilo es, generalmente, corto y bífido. (Ceballos, L. 1979).

1.1.5. El fruto.

El fruto del olivo es una drupa de mesocarpio carnoso y rico en lípidos, de forma y dimensiones diversas según distintas variedades.

El epicarpio está muy unido al mesocarpio y, durante la maduración, pasa de un color verde suave a violeta-rojizo y, por último, a una coloración negruzca.

El endocarpio está formado por un hueso fusiforme, muy duro, que protege una sóla semilla. Este hueso es de distinta forma según la variedad.

2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL OLIVO.

2.1. Distribución a nivel mundial.

A pesar del origen mediterráneo del cultivo, el olivo se ha llegado a introducir también en regiones tan distantes como los Estados Unidos de América, Argentina y Australia, siendo llevado allí por los colonizadores, aprovechándose del hecho de encontrarse climatologías similares a la de la cuenca del Mediterráneo.

A falta de mapas de distribución geográfica a nivel mundial, el siguiente cuadro nos presenta la producción en diferentes países:

Países	1974-76	1984
	Miles Tm.	Miles Tm.
MUNDO	3.547	3.670
AFRICA:		
Libia	134	110
Marruecos	278	250
Túnez	635	400
AMERICA:		
U.S.A.	62	33
Argentina	87	110
ASIA:		
Jordania	23	40
Líbano	54	50
Siria	202	370
Turquía	833	800
EUROPA:		
EUR-12	5.991	7.179
España	2.048	3.418
Francia	15	11
Grecia	1.233	1.400
Italia	2.378	2.050
Portugal	317	300
Albania	47	25
Yugoslavia	16	20
OCEANIA:		
Australia	3	2

(Tomado del Anuario de Estadística Agraria. 1985. M.A.P.A.)

2.2. Distribución en la cuenca mediterránea.

El área geográfica del olivo en el Mediterráneo se extiende entre las latitudes 18 y 45 del hemisferio boreal, con zonas marginales aisladas hacia el Norte o el Sur de dichos paralelos. La franja olivarera que circunda el Mediterráneo no aparece delimitada exactamente por los paralelos citados, pues la orografía modifica el factor térmico, y las cadenas montañosas aumentan o disminuyen la profundidad de penetración del olivo en las zonas litorales, según actúen como abrigos protectores o, por el contrario, acentúen el descenso de la temperatura.

En la Figura 1 se puede observar el área actual del cultivo del olivo en la cuenca mediterránea.



Figura 1. Principales países oleícolas de la cuenca del Mediterráneo.

Una buena idea de la distribución del olivo pueden dar también los siguientes datos, relativos al comercio internacional de los principales países exportadores del área:

Países	Importaciones			Exportaciones		
	Miles de Tm.			Miles de Tm.		
	1982	1983	1984	1982	1983	1984
Italia	75	205	165	43	52	82
Portugal	12	1	2	3	4	4
España	--	--	--	34	72	46
Grecia	--	--	--	45	148	116
Marruecos	--	--	--	1	1	1
Túnez	--	--	--	59	36	76
Turquía	--	--	--	21	64	21
Gaza (Palestina)	--	--	--	7	5	5
Jordania	9	5	6	1	2	1

(Tomado del Anuario de Estadística Agraria. 1985. M.A.P.A.)

2.3. Distribución en España.

La primera mención escrita de los olivares en España figura en "Bellum Hispaniense", obra atribuida originalmente a Julio César (Herrero, M. 1950), aunque hoy día se sabe que fué escrita por uno de sus oficiales. Dicha obra cuenta como las tropas de Julio Cesar sufrieron una derrota frente a las de Pompeyo en un olivar de la Bética.

Por tanto, en el siglo I (a. de J.C.) la Bética se encontraría ya con los antepasados de los olivos de nuestro siglo.

En nuestros días, la España olivarera puede dividirse

en diez grandes zonas (Puerta, C. de la 1972):

Zona 1. o del Picual.- Comprende toda la provincia de Jaén y las comarcas de Iznalloz (Granada) y Bujalance (Córdoba).

Zona 2. o del Hojiblanco.- Comprende la provincia de Córdoba -excepto las comarcas de Bujalance (Picual)- y la Carlota (Lechín), las comarcas de Estepa (Sevilla), Loja (Granada) y las de Archidona y Norte de Málaga.

Zona 3. o Andalucía Occidental.- Comprende la provincia de Sevilla -excepto la comarca de Estepa-, la comarca de La Carlota (Córdoba) y las provincias de Huelva y Cádiz.

Zona 4. o Andalucía Oriental.- Comprende las provincias de Málaga -excepto las comarcas de Archidona y Norte (Hojiblanco)-, de Granada -excepto las comarcas de Iznalloz (Picual) y Loja (Hojiblanco)- y la de Almería.

Zona 5. o Extremadura.- Comprende las provincias de Badajoz, Cáceres y Salamanca.

Zona 6. o Centro.- Comprende las provincias de Avila, Madrid, Toledo, Ciudad Real, Cuenca, Guadalajara y Albacete.

Zona 7. o Levante.- Comprende las provincias de Murcia, Alicante y Valencia.

Zona 8. o Valle del Ebro.- Comprende las provincias de Alava, Navarra, Logroño, Zaragoza, Huesca y Teruel.

Zona 9. o Tortosa-Castellón.- Comprende el sur de la provincia de Tarragona (comarca del Bajo Ebro) y la de Castellón.

Zona 10. o de la Arbequina.- comprende las provincias de Lérida, Tarragona -excepto la comarca del Bajo Ebro- y las de Barcelona, Gerona y Baleares.

Cada una de éstas diez zonas se encuentra, a su vez, subdividida en comarcas, resultando un total de 141 comarcas olivareras en España.

En la Figura 2 podemos ver la distribución geográfica de las 10 zonas (Puerta, C. de la 1972). Y en la Figura 3, la distribución de la producción de aceite en dichas zonas.

3. VARIEDADES DEL OLIVO.

Existe una gran confusión en cuanto a la clasificación del olivo en variedades. Desde el punto de vista botánico, hay dos variedades que sí son universalmente aceptadas: *Olea europaea* var *sylvestris*. Brot, o acebuche, forma espontánea y no cultivada, y *Olea europaea* var *europaea*, forma cultivada (Tutin, T.G. 1972). El problema se presenta cuando se trata de clasificar a esta última.

Los principales intentos de clasificación en variedades los encontramos en la primera mitad del presente siglo, hechos por diversos autores de la cuenca mediterránea, como Bobone, L. (1933); Savastano, G. (1939); Scaramuzzi, F. (1950); Francesconi, F. (1952) y Ortega- Nieto, J.M. (1955).

Cada uno de ellos clasifica las variedades conocidas en su región, asignando denominaciones locales. Rallo-Romero, L. y Cidraes, F. (1975), se refieren a la confusión entre los conceptos botánicos y agronómicos de variedad indicando que "la diferencia entre los conceptos de variedad botánica y cultivar ha originado un notable confucionismo en los estudios de variedades cultivadas del olivo, en particular en lo referente

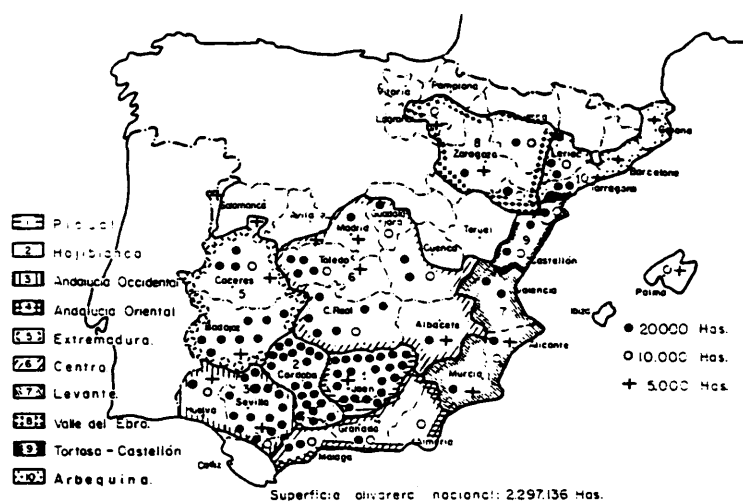


Figura 2. Distribución de la superficie olivarera nacional.

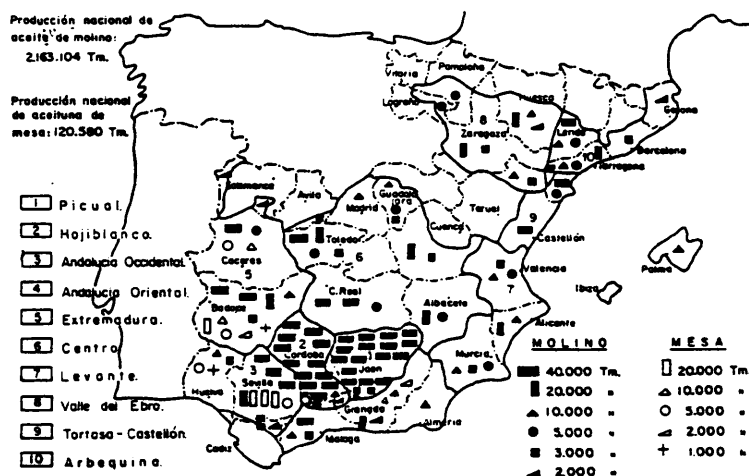


Figura 3. Distribución de la producción de aceite en las zonas olivareras.

al establecimiento de sinonimias, por las llamadas denominaciones científicas, basadas en criterios de discriminación morfológica claramente insuficientes o, incluso, aún más arbitrarios"

Sin entrar en discusión, nos basaremos en la clasificación que hace Ortega Nieto (1955), a la que se refieren la mayoría de los libros y folletos de divulgación agraria en España.

La importancia que tiene el conocimiento de las variedades está, no sólo en el hecho de que cada una se adapta a determinadas condiciones ambientales, sino también en que presentan distintos patrones de resistencia-sensibilidad ante las diferentes enfermedades. En concreto podremos registrar la sensibilidad ante la tuberculosis del olivo.

4. ENFERMEDADES PARASITARIAS DEL OLIVO.

La cantidad de enfermedades parasitarias del olivo que se han descrito hasta la actualidad puede llegar a ser enorme, como la catalogación que hace F. de Andrés Cantero (1965), que llega a alrededor de 250 parásitos distintos: 110 insectos, 90 hongos, 13 arácnidos, 11 nemátodos, 5 bacterias, 5 pájaros, 4 musgos, 4 mamíferos, 3 líquenes y 3 angiospermas. Posteriormente el mismo autor (Benlloch, M. y Andrés, F. de 1972) en su nueva clave sistemática, los reduce a unos 65.

Ruiz Castro, A. (1948, 1951), en el concienzudo estudio que realizó sobre la fauna entomológica del olivo en España, reduce a siete el número de insectos que realmente

tienen importancia como parásitos.

Estas variaciones en el número de los organismos que pueden ser considerados parásitos del olivo, vienen dadas por el criterio que tenga el investigador: en unos casos se describen todos los organismos asociados ecológicamente al olivar, mientras que en otros se describen exclusivamente aquellos que realmente producen daños económicos en el olivar.

Arambourg (1975), tras haber confeccionado la lista de la composición de la fauna parásita del olivo en cuatro zonas ecológicamente diferentes: España, Grecia, Siria y Túnez, demuestra la gran variación de frecuencia o ausencia de ciertas especies según el medio, y la permanencia de otras cuando el medio es similar. Según este autor, en cada país o zona, la fauna entomológica está sujeta a variaciones tanto más importantes cuanto más diversas sean las condiciones ecológicas.

Arambourg clasifica en España 9 Coleópteros, 2 Dípteros, 5 Lepidópteros, 15 Hemípteros y 1 Tisanóptero. De todos ellos, sólo 7 son comunes en las cuatro zonas estudiadas: *Hylesinus oleiperda*. Bern, *Phloeotribus scarabeoides*. Bern. (Coleópteros), *Dacus oleae*. Gmel. (Díptero), *Prays oleae*. Bern. (Lepidóptero), *Euphyllura olivina*. Costa, *Parlatoria oleae*. Colv. y *Saissetia oleae*. Bern. (Hemíptero).

Este autor nos señala también la importancia económica de las principales plagas del olivo en catorce países oleícolas, clasificando en tres grandes grupos los principales parásitos según la importancia de las pérdidas en la producción:

- Grupo 1: Importancia económica preponderante en todas

las zonas:

.*Dacus oleae*.
 .*Prays oleae*.
 .*Saissetia oleae*

- Grupo 2: Importancia económica media, o localizada.

.*Hylesinus oleiperda*.
 .*Perrisia oleae*.
 .*Clinodiplosis oleisuga*.
 .*Zeuzera pyrina*.
 .*Phloeotribus scarabeoides*.
 .*Euzophera pinguis*.
 .*Euphyllura olivina*.
 .*Aspidiotus hederae*.
 .*Liothrips oleae*.

- Grupo 3: Sin importancia económica:

.*Oecophyllembius neglectus*.
 .*Margarodes unionalis*.
 .*Parlatoria oleae*.
 .*Pollinia pollini*.
 .*Lepidosaphes ulmi*.
 .*Glyphodes unionalis*.



Es de destacar en esta relación, que los tres parásitos clasificados en el Grupo 1 están entre los siete comunes a las cuatro zonas estudiadas por Arambourg. Concluye que "la olivicultura mediterránea está dominada por tres

fitófagos principales del Grupo 1, contra los cuales la lucha es ineludible y a estos se unen, según las condiciones locales, especies del Grupo 2 más o menos numerosas, pero cuyo impacto económico puede revestir cierta importancia. Por ejemplo, *Liothrips oleae* en España o *Euphyllura olivina* en Túnez. Por último, las especies del tercer grupo no deben olvidarse totalmente pues representan un peligro potencial que puede transformarse en un grave problema si el medio natural se encuentra con un manejo brutal y desordenado por parte del agricultor".

En el objetivo de esta tesis no está la sistemática completa de los parásitos del olivo, sino sólo aquellos que tengan importancia en la zona estudiada y, fundamentalmente, aquellos que puedan tener una relación con la tuberculosis del olivo.

4.1. La mosca del olivo (*Dacus oleae*. Gmel.)

La mosca del olivo, *Dacus oleae*. Gmel., es un insecto del orden Diptera, familia Tephritidae, considerado por todos los especialistas en oleicultura como el peor enemigo de dicho fruto (Ruiz Castro. 1948, Arroyo Varela. 1964, Arambourg. 1975, Loussert. 1980, Ministerio de Agricultura . 1983).

Se encuentra distribuido por todas las zonas olivareras de la cuenca mediterránea, extendiéndose hasta el Este de Asia, así como al Sur y Oeste de Africa.

Es un insecto específico del olivo, su larva no se desarrolla sobre ninguna otra especie vegetal, y nunca se ha podido cultivar en medio artificial.

El insecto adulto es de un tamaño algo menor que la mosca doméstica, de 5-8 mm. El macho es algo menor que la hembra. El color general del cuerpo es pardo rojizo, con tonos amarillentos y manchas negras. La cabeza es un poco más ancha que el protórax, de color castaño claro, con las antenas muy visibles. Los ojos son grandes, con irisaciones verdosas o azuladas. La trompa es amarillo oscuro. El tórax es pardo por su parte inferior y grisáceo por la superior, en la que destacan claramente tres líneas más oscuras. El escudete es muy típico, negro en su parte basal y amarillo-marfil en su borde posterior. Y de este color son también los hombros del pronoto y la zona de insección alar. Las alas son hialinas, con el estigma pardo y una pequeña mancha ahumada en el vértice y los balancines son blanquecinos. Las patas presentan un tono homogéneo pardo-amarillento, con el final de las tibias y los tarsos más oscuros. El abdomen está compuesto de cinco segmentos, y es de color pardo rojizo. En el macho tiene forma redondeada y en la hembra se prolonga el último segmento para formar una vaina protectora del ovíscapto, retractil, y que mide casi un milímetro. (Figura 4)

Los huevos, con la forma típica oval alargada de los Dípteros, miden entre 0.8 y 1 mm. de longitud. Son de color blanco lechoso. En el extremo anterior, o cefálico, puede verse que el polo micropilar presenta un ligero relieve.

La larva, en el momento de nacer, mide menos de 1mm. longitud, siendo casi transparente. En su desarrollo completo llega a medir hasta 8 mm. de longitud por 1.5 mm. de ancho. Es

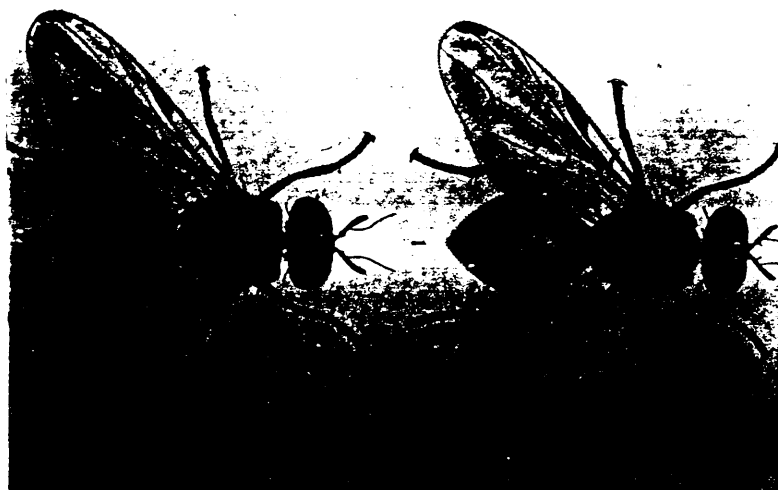


Figura 4. *Dacus oleae*, hembra (izquierda) y macho (derecha). Tomada de Ruiz Castro 1948.

una larva típica de Díptero, ápoda y aguzada por la parte anterior, en la que se ven muy bien, por transparencia, las mandíbulas, formadas por dos piezas quitinosas muy agudas.

La pupa es de forma elíptica, un poco alargada y truncada en sus extremos. De unas dimensiones que oscilan alrededor de los 4.5 mm. de largo por 2.5. de ancho, su color es pardo rojizo. En ella se distingue claramente la segmentación de la larva.

4.1.1. Ciclo biológico de *Dacus oleae*. Gmel.

El invierno lo pasa el insecto en forma de pupa, enterrado en la zona de protección de los árboles. En las zonas de inviernos suaves, como en algunas de Andalucía, se puede

encontrar el insecto adulto en sitios abrigados.

Desde pocas horas después de abandonar la pupa se convierte en un gran volador, desarrollando una gran actividad encaminada a buscar alimento. Su nutrición se basa en los nectarios de las flores, gotitas de líquido de las lesiones de los frutos, sustancias azucaradas que excretan ciertos hemípteros, también parásitos del olivo, como *Saissetia oleae*.

Según la temperatura ambiente y la alimentación que ha logrado encontrar, alcanza la madurez sexual a los ocho ó diez días de abandonar la pupa, aunque este intervalo se puede rebajar a dos días en condiciones óptimas (Arroyo Varela, 1964).

Una vez alcanzada la madurez sexual, el macho y la hembra se buscan para la cópula, produciéndose ésta parados sobre los árboles, nunca volando, al contrario que otros Dípteros.

A los tres días de la fecundación suelen empezar la puesta. El número de huevos que es capaz de poner una hembra es muy variable, al parecer, según las condiciones ambientales. Se puede admitir una media de 150 huevos por hembra (Arroyo Varela 1964), aunque Arambourg (1971) ha podido observar en el laboratorio (a 25°C e iluminación durante 10 horas) unas medias de puestas por hembra de más de 1000 huevos.

En zonas de clima seco y caluroso se ha notado un número de huevos menor que en las zonas del litoral, donde las puestas son generalmente más grandes (Loussert, R. 1980).

La puesta del huevo se realiza sobre la aceituna. La

hembra es muy cuidadosa en la elección de la aceituna que debe recibir el huevo. Antes de hacer la puesta recorre varias veces la aceituna elegida por toda su superficie, ya que, la primera condición que busca es que no tenga ya otra larva en su interior. En condiciones normales, sólo se encontrará una larva por fruto, aunque en años de fuertes invasiones o de escasa cosecha se pueden encontrar varias.

En el acto de la puesta, la hembra clava su ovíscapo a través del pericarpio, introduciendo el huevo en el mesocarpio, a una profundidad de 1.5 mm. aproximadamente.

La aceituna en la que se ha realizado la puesta puede ser reconocida inmediatamente con ayuda de una lupa, observándose una fisura que puede adoptar forma de V. A las pocas horas, la lesión producida puede ser observada a simple vista, como una mancha parduzca en el pericarpio. (Figura 5)

El desarrollo embrionario es de duración muy variable, según las condiciones de temperatura, como término medio podía adoptarse un intervalo de dos a tres días a principio de verano, y de ocho a diez para las últimas generaciones otoñales (Ruiz Castro. 1948).

En cuanto nace la larva, comienza a alimentarse con la pulpa del mesocarpio excavando una galería más o menos tortuosa. Este periodo larvario es también variable en relación con la temperatura ambiente, oscilando entre diez y veinticinco días.

Terminada la evolución del estado larvario, la pupa se forma en una cámara próxima a la superficie, sólo separada del exterior por un fino pericarpio que se va desecando. El período



Figura 5. Aceituna sobre la que ha realizado la puesta *Dacus oleae*, larva y pupa.

de pupa puede variar de ocho a diez días en las generaciones estivales, o bien desde los últimos días del otoño hasta la primavera en la última generación anual.

El imago desarrollado en la pupa emerge atravesando la debil película seca del pericarpio completándose así el ciclo. En las últimas generaciones autumnales, sin embargo, hemos podido constatar que la pupización se verifica casi exclusivamente en el suelo y por tanto, en este estado atraviesa el insecto el periodo invernal.

4.2. La polilla del olivo (*Prays oleae*. Bern)

Dentro del orden *Lepidoptera*, familia *Teneidae*, se encuentra la polilla del olivo, *Prays oleae*. Bern, el insecto

que causa más daños en el olivar, después de *Dacus oleae*.

El imago o insecto adulto es una mariposa de 12-14 mm. de envergadura, midiendo su cuerpo de 6 a 6.5 mm. con las alas plegadas. Sus alas anteriores son plateadas, manchadas de negro por su superficie. El segundo par de alas es uniformemente grisáceo y, a lo largo de su margen, salvo una pequeña porción basal del borde externo, presenta una continua franja de pelos. Las antenas son casi tan largas como la mitad de la longitud total del insecto. La probóscide mide unos dos tercios de la longitud de las antenas.

El macho es algo más pequeño que la hembra.

El huevo es lenticular, de contorno más o menos regularmente elíptico, blanquecino. Tiene aspecto reticulado no visible sin lupa, ya que mide 0.57 mm. de longitud máxima.

La larva, al salir del huevo, es una oruga de coloración crema clara, de 0.65 mm. de longitud, pero varía posteriormente en coloración y dimensiones, acentuándose a colores más fuertes hasta alcanzar 7-8 mm. de longitud.

La crisálida es de color pardo, midiendo 5-6 mm. de longitud, alojada en un capullo de forma oval alargada, blanco y constituido por escasos y finos filamentos. A través del capullo se puede ver el cuerpo de la crisálida.

4.2.1. Ciclo biológico de *Prays oleae*. Bern.

Esta especie tiene tres generaciones anuales, cuyos estados larvarios se desarrollan, respectivamente, en el parénquima foliar y yemas, flores, y dentro de la almendra del fruto. (Figura 6)

- Generación filófaga.

En esta generación, las puestas se hacen a finales de octubre o principios de noviembre sobre el haz de las hojas. La eclosión de los huevos ocurre quince o veinte días más tarde, originando oruguitas que excavan galerías sinuosas entre las dos epidermis de la hoja. Los daños ocasionados por estas larvas son siempre mínimos. En primavera terminan su desarrollo fuera de la hoja, devorando los brotes terminales de las ramificaciones jóvenes.

- Generación antófaga.

Las mariposas nacidas de las ninfas de la generación filófaga depositan sus huevos en el cáliz de las yemas florales justo antes de la floración. Las orugas jóvenes salidas de los huevos atacan los órganos florales, provocando la muerte de las flores. Los pétalos se secan y ennegrecen, quedando envueltos en los hilos de seda enganchados al racimo floral. Esta generación es muy perjudicial, pudiendo destruir, en años de fuertes ataques, la casi totalidad de las flores, determinando una cosecha prácticamente nula.

- Generación carpófaga.

Hacia el principio del verano, las mariposas procedentes de la generación antófaga realizan sus puestas sobre el cáliz de las aceitunas. Las larvas nacidas de esta última puesta penetran hacia el interior del fruto hasta el hueso aún no esclerificado. A su paso causan la destrucción de los haces fibrovasculares, con lo que el fruto deja de ser alimentado, se seca y se cae. En caso de que no caiga el fruto, a principios

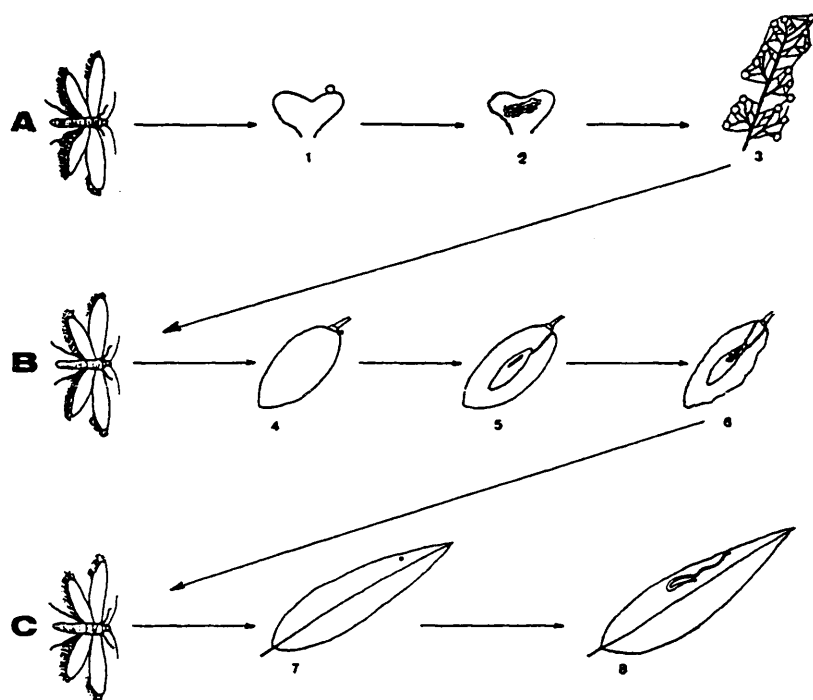


Figura 6. Ciclo biológico de *Prays oleae*. A, generación antófaga. B, generación carpófaga. C, generación filófaga. (De Loussert y Brousse. 1980).

del verano, la oruga devora la almendra, fabrica una galería en dirección al pedúnculo, produciéndose una segunda caída importante de frutos hacia el principio del otoño. Saliendo

cerca del punto de inserción del pedúnculo, la larva avanza a lo largo de las ramas para convertirse en crisálida bajo la corteza. La mariposa que sale del capullo, después de su acoplamiento, pondrá sus huevos sobre el haz de las hojas, cerrando así el ciclo, dando lugar de nuevo a la generación filófaga.

4.3. La cochinilla negra (*Saissetia oleae*. Bern.)

La cochinilla negra, *Saissetia oleae*. Bern, pertenece al orden Homoptera. Es el tercer parásito en importancia a nivel mundial. Aunque sus daños son menos cuantiosos que los dos anteriores, se pueden producir graves ataques de cochinilla tras el tratamiento con organofosforados, que se utilizan en la lucha contra *Dacus* y *Prays*, ya que, no sólo se destruyen estos dos insectos, sino que atacan también a los predadores de la cochinilla, siendo esta última resistente debido a su caparazón.

El adulto es una hembra partenogenética, de forma oval acortada, de 3-4 mm. de largo por 2-3 mm. de ancho. Lleva sobre su coraza unos relieves que forman la letra H. Su color inicial es pardo amarillento, que se va oscureciendo después de la puesta hasta castaño o negro. (Figura 7)

El macho, provisto de alas, antenas y cuatro ojos simples, es desconocido en la región mediterránea, donde todas las generaciones son partenogenéticas.

El huevo mide 0.3 mm. de longitud, siendo algo elipsoidal, de color rosa pálido que evoluciona a rojo oscuro.

Las larvas son ovaladas, aplastadas, de color amarillo

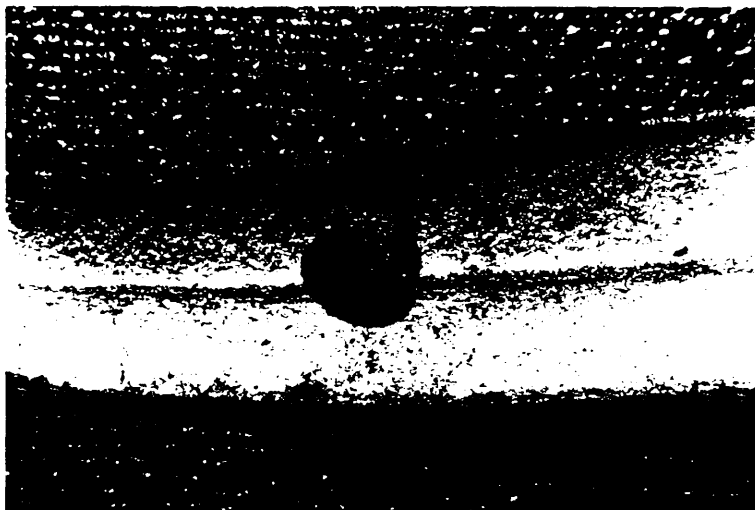


Figura 7. *Saissetia oleae*, adulto.

ocre, virando al pardo claro con la edad. Se aprecian tres estados larvarios que corresponden a tres mudas.

4.3.1. Ciclo biológico de *Saissetia oleae*. Bern.

La cochinilla pasa el invierno en las hojas del olivo, bajo la forma de larvas de segundo o tercer estado.

A comienzos de la primavera, las larvas abandonan las hojas, ya que son móviles, permaneciendo inmóviles sólo durante las mudas. Se fijan sobre los brotes y las ramas donde completarán su crecimiento.

Las hembras adultas empiezan a poner en el mes de abril, siendo la puesta de 800-1000 huevos. Durante la oviposición, la hembra se fija definitivamente sobre las ramas u hojas. El cuerpo aumenta de volumen, abombándose el dorso en

forma muy convexa. Todos los huevos quedan recogidos bajo la hembra. Durante este período de fijación, la hembra segrega una melaza azucarada que se puede observar que da un tono brillante a las hojas. Esta melaza constituye un ideal medio de cultivo para hongos, principalmente *Capnodium*, *Cladosporium* y *Alternaria*, que se instalan sobre la superficie, sin penetrar en los tejidos. Las hojas aparecen recubiertas como por un polvo negro, parecido al hollín (de ahí la denominación popular de negrilla o tizne), interrumpiéndose la fotosíntesis por falta de luz.

El período de desarrollo embrionario dura de dos a cuatro semanas, eclosionando escalonadamente durante varios meses. Las larvas jóvenes se desplazan al envés de las hojas a lo largo del nervio central, fijándose a continuación. Su evolución continua lentamente, llegando a su segundo o tercer estado antes del invierno.

Según las condiciones ambientales puede haber una o dos generaciones anuales.

4.4. El barrenillo del olivo (*Phloeotribus scarabeoides*).

Perteneciente al orden Coleoptera, a *Phloeotribus scarabeoides*, lo encontramos en el Grupo 2 de Arambourg, es decir, el de los parásitos de importancia media o localizada. Aunque sus ataques son muy irregulares, según los países y regiones, cuando estos se producen pueden ser muy importantes. En concreto en nuestros días en España, suelen darse ataques fuertes localizados de *Phloeotribus scarabeoides*, debido al abandono de la madera procedente de las podas por

parte de agricultores irresponsables.

El adulto mide 2 mm. de longitud, de cuerpo grueso y subcilíndrico. La coloración es fundamentalmente negra mate, y brillante en las partes lisas. Sus élitros presentan finas estriás con anchos espacios entre ellas cubiertos de escamas. La cabeza es negra, ojos negros y antenas de color castaño. (Figura 8)



Figura 8. *Phloeotribus scarabeoides*. (Tomada de Ruiz Castro 1948).

El huevo es de forma ovalada y presenta coloración blanquecina, con tinte ligeramente amarillo debido a una sustancia mucilaginosa que le recubre. Sus dimensiones son de 0.7 a 0.8 mm. de longitud por 0.5 mm. de ancho.

La larva atraviesa cinco etapas hasta llegar a la ninfa. Evoluciona desde una pequeña larva neonata de 0.8 mm. de

longitud, blanquecina, ligeramente amarillenta, más oscura en la cabeza y órganos bucales, hasta convertirse en una larva con un cuerpo más rollizo, arqueado, con lobulación marcada en tórax y abdomen. Cuando se aproxima la ninfosis llega a pesar veinte veces más que la neonata.

En el estado de ninfa, el insecto ya presenta las distintas partes constituidas del imago. Es de coloración lechosa con reflejos nacarados, especialmente en la cabeza y el tórax. De este claro fondo se van destacando, sucesivamente, los ojos compuestos y las mandíbulas, de coloración castaña, las patas posteriores de tonos ahumados, las articulaciones de patas y antenas, que terminan por distinguirse perfectamente bajo la cutícula ninfal.

4.4.1. Ciclo biológico de *Phloeotribus scarabeoides*.

El barrenillo, *Phloeotribus scarabeoides*, inverna en estado adulto en un pequeño albergue excavado en la base de un brote o de una yema axilar. En primavera, la pareja fabrica una galería de acoplamiento, normalmente en leña o residuos de poda, prolongada por una galería de puestas horadada justo bajo la corteza, en sentido perpendicular a la madera.

La hembra puede depositar de 60 a 120 huevos, de los que nacen las larvas xilófagas. Cada una de estas larvas va a emprender la excavación de una galería larval. Uno o dos meses después de la puesta se convierten en ninfas en el interior de su galería. El adulto, completada la metamorfosis, unos quince o veinte días más tarde, sale para emigrar, en este caso hacia el árbol. Las ramas atacadas se secan, porque la galería de

puesta forma alrededor de ellas una incisión anular que provoca la parada de la circulación de la savia.

5. LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO.

La tuberculosis del olivo es una enfermedad bacteriana producida por *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smith 1908) (Young et al. 1978) que acompaña al olivo, tanto a *Olea europaea* var. *europaea* como a *Olea europaea* var. *sylvestris*. Brot., en toda su extensión mundial, aunque la virulencia de la plaga sea diferente por las causas que veremos más adelante.

La enfermedad consiste en una hipertrofia de los tejidos afectados, principalmente las ramas, siendo perfectamente visibles las formaciones tumorales o tubérculos.

La tuberculosis raramente ataca a las hojas del olivo y cuando esto sucede, las lesiones se suelen localizar en el nervio central, sin que la proliferación tumoral sea excesiva, haciéndose rápidamente necrótica.

Por el contrario en adelfa (*Nerium oleander* L.), otra planta afectada por el mismo microorganismo, son muy frecuentes los tumores en hojas, siendo estos muy desarrollados, localizándose en cualquier parte de la hoja y manteniéndose activos más tiempo. *Nerium oleander* L. es una planta con muchas relaciones con el olivo ya que, además de su localización en toda la zona mediterránea, y sus relaciones taxonómicas (Tutin, T.G. 1972), comparte con el olivo tres de sus más característicos parásitos: *Saissetia oleae*. Bern, *Capnodium eleaophilum* y *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

La tuberculosis en el fruto se encuentra muy raramente (Petri y Gigante, citados por Pasinetti. 1953). Según estos autores, los tumores se desarrollan en la región basal del fruto, y pueden originarse en el tejido mesocarpiano, en el pedúnculo, o en ambos sitios a la vez. Los tumores jóvenes profundizan siempre poco en el mesocarpio, dejando intacto el endocarpio. Sólo raramente, cuando la infección ataca el fruto en los estados iniciales de su desarrollo y el endocarpio no está lignificado, se puede observar también una alteración más o menos acentuada de éste. Más frecuente que la infección directa del fruto, ocurre la formación de tumores en el pedúnculo, que llegan a abortar completamente la aceituna.

El ataque más frecuente de la tuberculosis se da sobre las ramas, principalmente cuando éstas son aún verdes. En los primeros estadios, los tumores son verdes, con el mismo tono que las ramas, aunque son más esponjosos y blandos al tacto. Poco a poco la superficie se va haciendo más rugosa, con surcaduras profundas, crateriforme, mientras el tejido tumoral se esclerosa, haciéndose leñoso y duro. Simultáneamente el color evoluciona desde el inicial verde-grisáceo, gris-marrón intermedio, hasta el negro final, como la corteza del tronco o las ramas viejas. Las ramas fuertemente afectadas pueden perder vigor o, incluso, llegar a secarse completamente al verse afectada toda la vascularización. (Figura 9)

Pasinetti (1953) describe también la existencia de pequeños tumores en las raíces, atribuyéndolos a la dispersión secundaria de la bacteria, y con las mismas características

morfológicas que los de las ramas.

Esta dispersión secundaria de la bacteria fué descrita ya por Smith (1908, 1920), que hablaba de "tubérculos

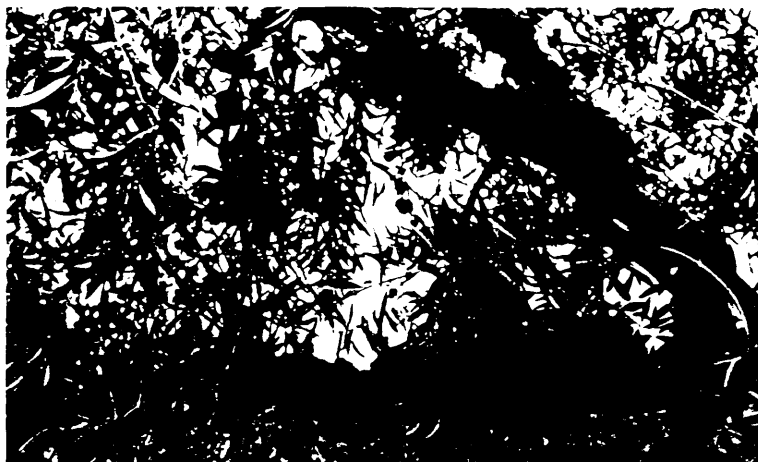


Figura 9. Rama de olivo con ataque fuerte de tuberculosis.

metastásicos" que se desarrollaban cuando la bacteria, procedente de un tumor primario, ascendía por el tallo a través de "vasos espirales", alojándose por el camino, dando los tumores secundarios.

5.1. Histología del tumor.

La histología de los tubérculos del olivo fué ya descrita por Smith (1920). Este autor constató la presencia de tejido leñoso difuso de forma irregular en la masa parenquimatosa del tumor, nódulos de elementos lignificados con paredes de gran espesor, algunos conteniendo muchas bacterias. En las hojas, Smith describió la presencia de zonas

hipertróficas y xilema desorganizado rodeando el canal de infección bacteriana.

Wilson (1965) estudió también el desarrollo de los tumores en adelfa, tras la inoculación experimental de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, reseñando las siguientes etapas: 1) Disolución de células, apareciendo una fisura alrededor de la colonia bacteriana. 2) Crecimiento anormal de un gran número de células alrededor de la fisura. 3) Proliferación de células hipertróficas, comenzando por las contiguas a la fisura y extendiéndose progresivamente hacia fuera. 4) Diferenciación de ciertas células en elementos de xilema. Las células que proliferaban se hacían multinucleadas y desarrollaban paredes alrededor de cada núcleo. Las nuevas células contenían un protoplasma más denso y núcleos y nucleolos más prominentes que los originales.

Surico (1977) ha descrito también la histología del tumor en olivos, tras la inoculación en diversas épocas del año. En todos los casos la primera reacción de los tejidos puestos en contacto con la bacteria era un rápido despertar, en verano e invierno, y una aceleración, en primavera, de la actividad del cambium. Alrededor de los bordes de la herida se desarrollan dos masas de nuevos tejidos que, por la actividad del cambium y de un nuevo felógeno que se diferencia, aumentan de volumen, fundiéndose y tomando el aspecto del típico tubérculo.

En el seno de los tejidos parenquimatosos que forman la masa del tumor, se diferencian elementos de xilema y floema irregularmente distribuidos u organizados en nódulos cíclicos.

En el tubérculo adulto, se origina una cavidad más o menos amplia que contiene las bacterias. Esta cavidad se extiende hacia la superficie, pudiendo ser vía de propagación de la bacteria al exterior. En este estado parecen comenzar procesos que conducen a la descomposición del tumor.

5.2 Agente etiológico: *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

La primera noticia de la existencia de esta bacteria fué en 1886, cuando Archangeli, al describir los tumores de la tuberculosis del olivo observó el microorganismo en el interior, al que llamó *Bacterium oleae*. Dicha observación no se puede considerar una descripción, puesto que sólo fue hecha a nivel microscópico, sin cultivos o pruebas de su patogeneidad por inoculación, ni siquiera se relacionaba la enfermedad con la bacteria puesto que se achacaba a otras causas (Smith 1920).

Fué Luigi Savastano (1886), con sus experimentos de inoculación el primero que probó que la tuberculosis del olivo era debido a una bacteria, aunque tampoco él describió al microorganismo suficientemente. Savastano llamó a la bacteria *Bacillus oleae-tuberculosis*.

Posteriormente, Smith, E.F. (1908) fué el primero que dió la denominación de *Bacterium savastanoi*, en honor a Luigi Savastano, y describió al microorganismo con todos los caracteres microscópicos y culturales de la época en su magnífica obra "An introduction to bacterial diseases of plants" (Smith, E.F. 1920).

Simultáneamente a estos hechos, van Hall (1902)

describe un microorganismo fitopatógeno para el lilo (*Syringa vulgaris*), una planta perteneciente también a la familia Oleaceae. A esta bacteria le dió la denominación de *Phytomonas syringae*. Smith (1920) habla de una posible variedad de *Bacterium savastanoi* que produce "la misma enfermedad, o una muy similar, en el fresno (*Fraxinus excelsior*)", pero que, a pesar de repetidas inoculaciones en *Olea europaea*, no producía tumores. También Smith, en la misma obra, trató ya de otra enfermedad igual en la adelfa (*Nerium oleander*), aunque, según sus observaciones, se debería a otro microorganismo distinto al de la tuberculosis del olivo. Este microorganismo parásito de la adelfa fue descrito después por Ferraris (1926) y denominado *Pseudomonas tonelliana*.

Estos descubrimientos, que son los más destacables y con más base científica de los que ocurrieron a principios del presente siglo, acompañaron a otros muchos que vinieron a complicar enormemente la taxonomía de las bacterias fitopatógenas. Se aislaron muchas cepas bacterianas de varias enfermedades de plantas y se las fué nombrando con la seguridad de que eran altamente específicas para su huésped y con respecto al tipo de lesión que producían. Muchas de esas especies son, hoy día, irreconocibles por sus descripciones originales, sus especificidades por huéspedes diferentes no fueron determinadas, y las cepas tipo perdidas.

Así en el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Vol. 1 (1984) cita, en el apartado correspondiente a *Pseudomonas syringae*. Van Hall 1902, las antiguas denominaciones que ha

tenido la especie:

Phytomonas syringae (Van Hall 1902); *Pseudomonas barkeri* (Berridge 1924); *Pseudomonas citrarefaciens* (Lee 1917), *Pseudomonas citriputrealis* (Smith 1913), *Pseudomonas hibisci* (Nakada y Takimoto 1923), *Pseudomonas prunicola* (Wordmald 1930), *Pseudomonas punctulans* (Bryan 1933), *Pseudomonas rimaefaciens* (Koning 1938), *Pseudomonas spongiosa* (Aderhold y Ruhland 1905), *Pseudomonas tonelliana* (Ferraris 1926), *Pseudomonas trifoliorum* (Jones, Williamson, Wolf, y Mc Culloch 1923), *Pseudomonas utiformica* (Clara 1932), *Pseudomonas vignae* (Gardner y Kendrick 1923) y *Pseudomonas viridifaciens* (Tisdale y Williamson 1923).

De este Manual han sido eliminadas otras decenas de denominaciones, entre ellas *Pseudomonas savastanoi* (Smith), que fué el nombre manejado principalmente para la variedad patológica del olivo hasta 1974, año en que salió el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8ª Edición. Otros nombres, considerados como sinónimos han sido omitidos en el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (1984), siguiendo la recomendación de Dye et al. (1975), ya que no están representados por auténticos cultivos o han sido inadecuadamente descritos.

La principal base para la actual clasificación de las especies de *Pseudomonas* son los grupos propuestos por Palleroni (1973) en base a sus estudios de homologías de rRNA/DNA. Esta subdivisión del género está, con algunas excepciones, de acuerdo con los grupos fenotípicos expuestos ya en la 8ª Edición del "Bergey's Manual".

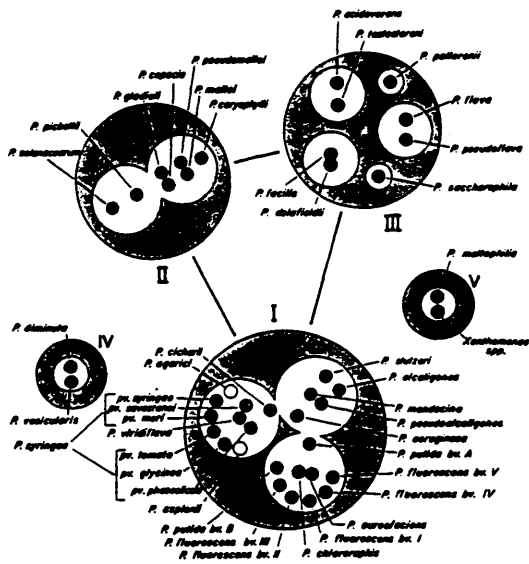


Figura 10. Especies de *Pseudomonas*, biovariedades y patovariedades ordenadas de acuerdo con homologías de rRNA y DNA. Los círculos grandes representan grupos de homología de rRNA, dentro de los cuales, los círculos blancos indican grupos de homología de DNA. El grupo diminuta (Grupo IV) y el grupo *P. maltophilia*-*Xanthomonas* (Grupo V) están incluidos por referencia, pero aparecen no conectados a los grupos de *Pseudomonas*. La asignación de *P. agarici* y *P. asplenii* al grupo "fluorescente" de homología de DNA dentro del Grupo I es solo tentativa (Modificado de Palleroni et al. 1973).

Los grupos definitivos de las especies se representan en el "Bergey's Manual" (1984) con la imagen reproducida en la Figura 10.

Por desgracia, hay aún un gran número de especies que no están incluidos aquí y habrá que esperar estudios posteriores ya que sus relaciones resultan desconocidas por el momento.

Con estos criterios, el "Bergey's Manual" (1984) nos presenta una clave para los anteriormente citados Grupos I, II y III, de la cual exponemos la parte correspondiente al Grupo I:

A. Poli β -hidroxibutírico no acumulado como sustancia de reserva de carbono, excepto para algunas cepas de *P. pseudoalcaligenes*.

1. Producción de pigmentos fluorescentes por la mayoría de las cepas.

a) Presencia de Arginina dihidrolasa; saprófitos o patógenos oportunistas para animales.

1. *P. aeruginosa*
2. *P. fluorescens*
3. *P. chlororaphis*
4. *P. aureofaciens*
5. *P. putida*

b) Ausencia de Arginina dihidrolasa; fitopatógenos.

i. Oxidasa negativa.

6. *P. syringae*
7. *P. viridiflava*

ii. Oxidasa positiva.

8. *P. cichorii*

2. No producen pigmentos fluorescentes.

a) Usan glucosa para crecer

9. *P. stutzeri*

10. *P. mendocina*

b) No usan glucosa para crecer

11. *P. alcaligenes*

12. *P. pseudoalcaligenes*.

Por tanto, se puede caracterizar a la especie *Pseudomonas syringae* como bacilos Gram-negativos, con dimensiones de 0.7-1.2 por 1.5-3 ó más $\mu\text{m.}$, pudiendo presentarse a veces, como largas cadenas o filamentos, móviles por flagelos en un sólo polo (lofotricos) ("Bergey's Manual" 8ª Ed. 1974), que producen pigmentos fluorescentes en medios deficitarios en hierro (Cody, Y.S. et al. 1987 a) y que se diferencian de otros *Pseudomonas* fluorescentes por dar negativas las pruebas de la Oxidasa (Kovacs 1956) y la Arginina dihidrolasa (Lelliot, R.A. et al. 1966).

Las cepas de *Pseudomonas syringae* no requieren, normalmente, factores orgánicos de crecimiento. El crecimiento de la mayoría de las cepas en medios minerales con una sola fuente de carbono es lento, y en medios complejos es relativamente lento. El espectro nutritivo es menos extenso y menos heterogéneo que el de los otros *Pseudomonas* saprófitos fluorescentes.

Su temperatura óptima es de 25 a 30° C.

Una vez vistas estas características generales de la especie, nos encontramos un gran parecido con otra especie muy

próxima: *Pseudomonas viridiflava*. Burkholder 1930. A pesar de las múltiples características morfológicas y de nutrición que compara el "Bergey's Manual" (1984) en tres grandes cuadros basados en trabajos de varios autores, la mayoría de ellas no nos diferencian *Pseudomonas syringae* de *Pseudomonas viridiflava*. Las únicas pruebas que distinguirían a *Pseudomonas viridiflava* serían su incapacidad para utilizar sacarosa y su capacidad para usar D (-) tartrato. Este último sustrato es usado, además de esta bacteria, por *Pseudomonas syringae* pv. tomato, y raramente por otras especies y variedades patológicas. Finalmente, había que destacar que *Pseudomonas viridiflava* es patógena de las judías (*Phaseolus vulgaris*), en las que produce unas lesiones características, diferentes de las que podrían producir los distintos patotipos de *Pseudomonas syringae*.

En cuanto a variedades patológicas de *Pseudomonas syringae*, y los respectivos neopatotipos, actualmente es vigente la lista dada por Dye et al. (1980), que agrupa 41 variedades. En dicha lista se incluyen los nombres de las principales plantas huéspedes y de sus familias botánicas.

La mayoría de estas variedades descritas no pueden ser distinguidas entre sí, salvo por la especificidad por el huésped, a pesar de los intentos hechos por diferentes autores en estudiar los caracteres fenotípicos, principalmente de nutrición (Misaghi et al. 1969, Sands et al. 1970 y 1980).

A.K. Vidaver y S. Buckner (1978) han intentado la clasificación de *Pseudomonas* fitopatógenos fluorescentes en bacteriocinotipos, ordenándolos en 16 grupos productores de

bacteriocinas, incluyendo grupos nuevos entre los descritos previamente por otros autores. Al menos el 86% de las cepas de *Pseudomonas syringae* pueden ser tipadas por la producción de bacteriocina. Esta clasificación, en principio, no parece tener ninguna utilidad, por existir poca correlación entre bacteriocinotipo y planta huésped y ninguna correlación con la producción de fitotoxinas.

La variedad que nos interesa, la patógena del olivo, queda finalmente reflejada en el "Bergey's Manual" (1984), con la base anteriormente citada, de la siguiente manera.

- *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smith 1908) Young et al. 1978.
- Huéspedes: olivo (*Olea europaea*), *Fraxinus* spp. (familia Oleaceae).
- Cepa Neopatotipo: ATCC 13522 (PDDCC 4352; NCPPB 639).

5.2.1. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* como epífita.

Desde principios de siglo se sabe que la superficie de las hojas están colonizadas por microorganismos (Leben, C. 1961), no obstante, la demostración de que parte de esa comunidad microbiana eran bacterias fitopatógenas la realizó Crosse en 1959, cuando aisló *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* en grandes cantidades a partir de hojas de cerezos sanos. Crosse sugería que la presencia de estas poblaciones de bacterias fitopatógenas supondría el inóculo para la infección de las plantas.

En 1960 English et al. descubren la presencia de *Pseudomonas* verde-fluorescentes, presumiblemente *Pseudomonas*

syringae, no sólo en hojas de melocotoneros y almendros sanos, sino en frutos, ramas y hierbas de los alrededores. Por eso también sugiere a esta flora como inóculo de las enfermedades de los frutales.

Estos hallazgos específicos llevan a Leben (1965) a generalizar un nuevo concepto: que las bacterias fitopatógenas son capaces de tener una fase de crecimiento residente o epifítica en el huésped sano. En determinadas condiciones, serían bacterias dispuestas a desencadenar la enfermedad.

Desde entonces, numerosas investigaciones han descrito multitud de casos en los que las bacterias fitopatógenas han sido encontradas en la superficie de las hojas de plantas sanas. En algunos casos, se ha demostrado un crecimiento epifítico, en otros, simplemente se ha asumido que ocurría (Hirano et al. 1983).

Uno de los problemas que se plantean a la hora de estudiar las bacterias epifitas es el método a seguir para que los resultados sean fiables y de aplicación universal. Los métodos seguidos hasta el momento han sido tres:

a) Observación directa in situ

Las técnicas microscópicas han sido usadas para determinar la distribución espacial o localización preferente de las bacterias en la superficie de las hojas (Baker, J.H. 1981). A pesar de que estas técnicas se utilizan sólo con fines cualitativos, existe el problema de las grandes pérdidas de flora que se producen al realizar tinciones. Para solucionar este problema se han desarrollado unas ingeniosas técnicas de

impresión (Birkby et al. 1981, Dickinson et al. 1974). Dichas técnicas consisten básicamente, en rociar la superficie de las hojas con materiales que polimerizan formando una resina que se puede desprender, teñir y observar microscópicamente.

También se ha utilizado la microscopía electrónica de barrido (Roos et al. 1983), con la que se ha observado, en un caso concreto, que las cavidades subestomáticas de las hojas de cerezo son sitios protegidos en donde se refugian poblaciones de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. Las bacterias son capaces de reproducirse en dichas cavidades y emerger en masa a los seis días.

No se ha desarrollado ningún método concreto y específico para *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

b) Cultivo de las bacterias.

Los métodos de cultivo de microorganismos son, con mucho, los más empleados en análisis, tanto cualitativos como cuantitativos.

En análisis cualitativos se emplean diferentes técnicas de obtención de réplicas de las bacterias localizadas sobre la superficie de las hojas y aplicarlas sobre placas con medio sólido. Las réplicas se pueden obtener presionando directamente la hoja sobre el agar, con globos, con terciopelo, con parafilm, etc. (Hirano et al. 1983). Los medios de cultivo pueden ser selectivos o diferenciales, con lo que se puede eliminar el crecimiento de la flora no deseada.

En análisis cualitativos el método general que han utilizado los diversos autores consiste en remover las

bacterias de la superficie, diluir y sembrar en placas. El principal problema de estos análisis, es la disparidad de criterios en el primer paso: la obtención de las bacterias. La mayoría de los trabajos se basan en el lavado, aunque difieren en la composición de la solución empleada y el tiempo (desde 30 segundos hasta 240 minutos).

Practicamente todos los trabajos desarrollados por diferentes autores sobre la ecología de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* están realizados con este tipo de técnicas.

Queda muy claro en todos los casos, sea cual sea la técnica empleada, que *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, está presente siempre sobre la planta huésped, tanto *Olea europaea* como *Nerium oleander*.

Tras la demostración de que la bacteria tenía una fase residente sobre las hojas del huésped (Ercolani. G.L. 1971), vinieron los estudios sobre las variaciones de la población (Ercolani G.L. 1979), en los que se constata que dicha población se ve afectada por interrelaciones entre la edad de la hoja y el tiempo de formación de esta; el tiempo de la formación de la hoja y la época del año. No se encuentran diferencias significativas entre poblaciones de hojas de la misma edad colectadas en el mismo tiempo del año, ni entre ramas cosechadas o no cosechadas, ni entre ramitas de la parte interna o externa del árbol. El nivel de bacterias más alto se encontraba en primavera (9.4×10^4 bacterias /cm².) y en otoño (1.6×10^4 bacterias /cm².), precisamente cuando son más frecuentes los ataques de la tuberculosis del olivo. En verano e

invierno, la población del patógeno se ve reducida, respectivamente, a 7.3×10^2 bacterias/cm² y 5.1×10^3 bacterias /cm².

Estos resultados de Ercolani, difieren significativamente de los obtenidos por Lavermicola y Surico (1987 a), probablemente por la diferente metodología seguida en la obtención de las bacterias y en los medios de cultivo empleados. Según estos últimos autores, sobre las hojas, el número más alto de bacterias se registraría al principio del verano (4×10^3 bacterias /cm²) y en noviembre (4.2×10^2 bacterias /cm²). A finales del invierno y finales del verano estos números se reducían, respectivamente, a 45 y 3 bacterias/cm².

En las pequeñas ramas del olivo, se encuentran valores significativamente más altos, aunque siguiendo una secuencia similar a la de las hojas: A principio del verano 1.5×10^5 bacteris /cm².; en noviembre 4.9×10^3 bacterias /cm².; llegando a los mínimos valores al final del invierno (47 bacterias /cm².) y al final del verano (9 bacterias /cm².).

Estos mismos autores obtuvieron parecidos resultados al estudiar la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* sobre hojas y ramas de *Nerium oleander*.

El hecho de que la densidad de población bacteriana aparezca más alta siempre en las ramas de olivo o adelfa que sobre sus respectivas hojas, parece sugerir que el patógeno encuentra sobre las ramas mejores condiciones para su multiplicación.

La reproducción de las bacterias sobre las hojas ha sido demostrada por Hirano (1985), que apunta como la lluvia parece ser una especie de disparador para el rápido crecimiento de los microorganismos, registrándose tiempos de generación de 3.5 a 4.5 horas después de una lluvia, con incrementos de la población media de 30 a 150 veces en 24 horas.

Ercolani (1982, 1983, 1985) analizó las fluctuaciones de la población, no en cuanto a cambios en el número, sino en cuanto a cambios en los fenotipos predominantes, según se tomaran las muestras en una u otra época del año, según el momento de formación de las hojas, y según una serie de parámetros ambientales. Estos trabajos confirmaban que *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* estaba sometida a fluctuaciones estacionales en el filoplano del olivo, también formulaba cuestiones adicionales sobre la composición de las poblaciones bacterianas que colonizan la superficie de hojas de diferentes edades en distintos momentos del año. Las preguntas a formular para explicar estas variaciones fenotípicas serían las siguientes: ¿Es posible que como consecuencia del activo crecimiento de la bacteria en determinados momentos, los microorganismos sean capaces de evolucionar rápidamente?, o bien ¿Son estas variaciones fenotípicas de la población la consecuencia de una alternancia de generaciones heterogéneas, cada una de ellas mejor adaptada a unas determinadas condiciones ambientales?.

Según Hirano (1985), la posibilidad de que se den varias generaciones por día puede dar lugar a la amplificación

de pequeños cambios por generación hasta dar, en un período de tiempo relativamente corto, grandes cambios de población. Esta autora se inclina claramente hacia la contestación afirmativa a la primera pregunta, aunque sólo como hipótesis, ya que no aporta pruebas. Por el contrario Ercolani (ver referencias citadas anteriormente), ha comprobado que rociando las hojas con una mezcla adecuada de bacterias con diferentes características fenotípicas, se reproducía la alternancia de poblaciones de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* a lo largo del tiempo. Los experimentos también mostraban que los caracteres fenotípicos de cada población permanecían estables durante el crecimiento en el filoplano. Por tanto, estas experiencias serían la contestación afirmativa a la segunda de las preguntas formuladas anteriormente. Es decir, es la alternancia de poblaciones heterogéneas, más que la modificación de una población homogénea, la responsable de las fluctuaciones fenotípicas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* en la naturaleza.

c) Estimación del tamaño de la población por la capacidad criogénica de las bacterias.

Como veremos en el apartado 5.2.5. (Relación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con las heladas), se ha demostrado que la presencia de esta bacteria como epífita incrementa los daños producidos por las heladas, ya que determinadas moléculas de su superficie catalizan la formación de hielo a partir de agua superenfriada.

Lindow (1978 a y b, 1983) encontró unas relaciones cuantitativas entre poblaciones de bacterias con capacidad

criógena (INA) y daños por heladas. Los tamaños de dichas poblaciones, tras varios tratamientos bactericidas y de bacterias competidoras sobre hojas de maíz, oscilaban de 10^2 a 10^6 u.f.c. por gramo de tejido de hoja. Cuando las hojas eran sometidas a temperaturas de -4.5 a -5.0 °C. bajo condiciones controladas, la cantidad de daños por heladas se podía relacionar con la cantidad de bacterias.

5.2.2. Presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* en el suelo.

Generalmente se cree que los fitopatógenos bacterianos no están bien adaptados a sobrevivir en el suelo. Buddenhagen (1965) catalogó a las bacterias fitopatógenas encontradas en el suelo en tres grupos: visitantes transeúntes, visitantes residentes y residentes. Al parecer la mayoría de estas bacterias pertenecen a la primera categoría, entre ellas varios representantes del género *Pseudomonas*, como *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Shuster et al. 1974).

Hay una gran cantidad de trabajos de investigación que tratan de estudiar la supervivencia en distintos habitats de las variedades patológicas que afectan a plantas anuales, ya que, en estos casos, no hay posibilidad de explicar la permanencia del inóculo de forma continuada, como hemos visto que ocurre en el olivo. Así, se ha demostrado que *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* puede transmitir la enfermedad al tomate encontrándose la bacteria en el suelo desde el momento de la germinación de la semilla (Schneider et al. 1977). Lo mismo se puede decir de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* con respecto a

la soja (Daft et al. 1972).

En cuanto a la bacteria que nos ocupa, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, no hay trabajos que traten de explicar su supervivencia en el suelo.

5.2.3. Relación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con insectos.

Smith (1920) nos habla ya de que Petri en Italia había demostrado en su trabajo "Ricerche sopra i batteri intestinale della Mosca olearia", que la mosca del olivo, *Dacus oleae*, portaba el bacilo de la tuberculosis del olivo junto con el bacilo amarillo (*Ascobacterium luteum*. Babes, según la nomenclatura que usa el propio Smith) en sus glándulas salivales y divertículos intestinales como un ocupante regular, simbiótico.

Ruiz Castro (1948), también se refiere a este hecho, que transcribimos literalmente, al hablar de la larva de *Dacus oleae*: "Sobre este punto es interesante recordar que en la pequeña larva existe un foco inicial de patogeneidad, según atestiguan los notabilísimos estudios de Petri. Se trata del *Bacterium savastanoi*. Petri (agente de la terrible tuberculosis del olivo) y el inofensivo *Ascobacterium luteum* (en relación simbiótica con todos los estados de la especie *Dacus oleae*), que se encuentran alojados dentro de cuatro grandes abultamientos que existen al principio del intestino medio de la larva. Al pupizar se forma un órgano faríngeo dorsal que, en la imago, está repleta de bacterias y como la hembra tiene los oviductos unidos en parte al intestino, lleno de bacterias, la

infección se mantiene a través de los huevecillos, por cuyo micropilo penetran aquellas para contaminar el embrión".

También Gorlenko (1965) incide sobre el tema, indicando que, debido a la transmisión transovárica, la bacteria se encuentra en todas las etapas de desarrollo de *Dacus oleae*. Para este autor, la tuberculosis del olivo está más extendida en países en los que se encuentra la mosca, mientras que en los países en los que la mosca está ausente, la enfermedad se propaga muy lentamente. Por otro lado, nos habla de que se ha establecido un alto grado de relaciones simbióticas entre *Dacus oleae* y varias especies de bacterias (no especifica cuales), entre ellas la de la tuberculosis del olivo. La existencia del patógeno era probada por la infección de ramitas de olivo con una suspensión de cultivos obtenidos de los intestinos del insecto.

La relación simbiótica fué probada por Hagen (1966). Administrando a los adultos de *Dacus oleae* dietas que contenían Estreptomicina, daban huevos estériles, desde el punto de vista bacteriológico, de los cuales se podía obtener la larva. Las larvas eran incapaces de madurar en aceitunas, desarrollándose normalmente en un medio artificial que contenía un hidrolizado de proteínas, y no en medios con proteínas intactas. Se sugirió, por tanto, que la simbiosis sería necesaria para la degradación de los tejidos de la aceituna, posiblemente por proteolisis, ya que si no ocurre esto no serían asimilables por la larva (Fytizas et al. 1966). En trabajos posteriores (Fytizas 1970), el mismo autor probó varios antibióticos, deduciendo que las



tetraciclinas y viomicina producen el mismo efecto de prevenir el desarrollo de la larva.

Schuster (1974) trata también la transmisión transovárica de la bacteria, aunque para este investigador la mosca no es esencial para la supervivencia y transmisión de la bacteria. Lo más destacable de este trabajo es el método que denominan aposimbiosis. Basándose en los trabajos citados anteriormente sobre tratamiento con antibióticos de los insectos adultos, propone tratamiento similares sobre las plantas. De esta forma sería posible tratar al mismo tiempo el microorganismo y el insecto dependiente.

Parece claro, por las demostraciones existentes, que existe la asociación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con *Dacus oleae*, aunque queda por probar si el insecto puede actuar como vector en la transmisión de la tuberculosis del olivo.

Con respecto al resto de los parásitos del olivo, no hay ningún dato de asociación ni de que actúen como vectores.

5.2.4. Relación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con otras bacterias.

Ya hemos visto en el apartado anterior con Petri, según Smith (1920) cita la presencia simultánea del agente de las tuberculosis del olivo con otro microorganismo, al que llama *Ascobacterium luterum* Babes, en relación con *Dacus oleae*.

Anteriormente, ya Savastano había obtenido un microorganismo amarillo en alguno de sus cultivos, porque describe al bacilo de la tuberculosis del olivo como amarillo en un medio en el que no lo es (Smith 1920). Al mismo tiempo otros

autores, como Berlese en 1905, citado por Smith, consideraban al microorganismo amarillo *Bacillus oleae* (Arch) Trev. como la causa de un tipo de tubérculo.

Para Smith, todos estos hallazgos eran considerados como de bacterias saprófitas que acompañaban al patógeno.

La última referencia a estas bacterias la tenemos en Dash et. al. (1984), que se refieren a ellas como *Agrobacterium luteum*, presentes en la superficie de los olivos y que pueden ser adquiridos por la mosca del olivo, *Dacus oleae*, e incrementarse en los últimos estados larvarios. Esta denominación, que completa sería *Agrobacterium luteum* (Babes) Hellmuth. 1956, no aparece ya en el *Bergey's Manual* (8ª Edición), encontrándose en "species incertae sedis" la especie *Agrobacterium luteum* Ahrens y Rheinheimer 1967, que nada tiene que ver con la que nos ocupa, por tratarse de bacterias marinas (Allen y Holding, 1974). En el *"Bergey's Manual"* (1984), ya no se considera ninguna de estas especies incluídas en el género *Agrobacterium* (Kerstens y De Ley. 1984).

Con denominación o sin ella, está claro que hay una serie de bacterias, blancas o amarillas, que acompañan siempre a *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* en los tumores del olivo y en la mosca del olivo.

Esta asociación no es la única conocida en la especie, Gaitatis et al. (1987) describieron la asociación de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, con otras bacterias identificadas como *Xanthomonas* spp. en plantas de pimienta y tomate.

5.2.5. Relación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con las heladas.

Se ha dicho siempre que una de las principales causas de la tuberculosis del olivo son las heladas. Como recopilador del "saber popular" de los olivareros, Berrio Moreno (1976) nos dice en su obra que la capa exterior de las ramas del olivo es más sensible a las bajas temperaturas, por cuya causa se agrietan, dando lugar a la penetración de la bacteria.

Esta misma idea ha sido mantenida por Ingenieros Agrónomos, especialistas en el tema, como Loussert et al. (1980) o Mateo-Sagasta (1975). Este último autor, en concreto, al hablar de daños indirectos de los hielos, señala "la apertura de heridas de muy pequeño tamaño que, muchas veces pasan desapercibidas en el campo, y que son otros tantos puntos de infección por enfermedades posteriores, sobre todo *Pseudomonas savastanoi*, productor de la tuberculosis del olivo".

Antes de pasar a ver la relación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con las heladas vamos a exponer algunas generalidades sobre aspectos físico-químicos de la formación de hielo.

El hecho de que el punto de solidificación del agua sea 0° C no significa que por debajo de esa temperatura se produzca siempre la formación de hielo. El agua puede ser superenfriada hasta varios grados por debajo de su punto de solidificación hasta que se forma el hielo espontáneamente, o bien existe algún factor que cataliza la transición líquido-sólido. Los catalizadores de esta transición son conocidos con el nombre de

"núcleos de hielo" (Lindow 1983). Estos núcleos de hielo pueden ser partículas o moléculas tanto inorgánicas como orgánicas. Entre los núcleos de hielo inorgánicos, los más efectivos son el ioduro de plata y la caolinita. Entre los orgánicos, nos encontramos cristales de muchos compuestos biológicos: aminoácidos, proteínas, esteroides, terpenos, etc. Estos compuestos orgánicos son activos como núcleos de hielo a temperaturas relativamente templadas (-5°C), pero sólo si están en forma cristalina, cuando están solubilizados pierden su capacidad. Por tanto, dichos compuestos orgánicos no nos servirían como explicación de la congelación del material biológico, ya que en condiciones naturales se encuentran en solución.

El descubrimiento de que los núcleos de hielo podían tener un origen biológico (Vali. 1971, Schnell y Vali. 1972) causó un gran impacto entre los investigadores que estudiaban los daños por las heladas y los patólogos vegetales. Este descubrimiento permitió la identificación de dos bacterias que aparecían como epifitas, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens*, como las principales fuentes de núcleos de hielo. En concreto *Pseudomonas syringae* cataliza la cristalización de agua superenfriada a -1.5°C (Maki et al. 1974).

Además de cepas de las bacterias citadas, se han descrito otras, como *Pseudomonas* spp. y *Erwinia* spp, también activas como criógenas (Lindow 1983). Al referirnos a cepas, queremos decir que dentro de una misma especie se ha encontrado una gran variabilidad en la producción o no producción de

núcleos de hielo (Baca et al. 1987, Gross et al. 1984, Lindow et al. 1978 b), y dentro de las cepas criógenas también hay variabilidad cuantitativa. (Hirano et al. 1985).

A las cepas de bacterias productoras de núcleos de hielo se les denomina INA+ (Ice Nucleation Active), cuando se habla de su fenotipo; mientras que su genotipo es designado como "ice+". Por el contrario a las cepas sin capacidad criógena se las conoce, respectivamente, como INA- e "ice-" (Kozloff et al. 1984).

Las demostraciones de la posible relación de existencia de bacterias INA+ como epifitas, en las heladas e infección de la planta han sido muy variadas (Klement et al. 1984, Lindow et al. 1978 a. Süle et al. 1987). Una de las más claras es la de Süle et al., que han investigado la infección de *Prunus cerasus* con cepas INA+ e INA- de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. En los casos descritos, las hojas eran infectadas sólo cuando se había formado hielo en sus espacios intercelulares, lo que ocurría entre -2 y -3° C en presencia de cepas INA+.

En el caso de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, Lavermicola et al. (1987 b), en uno de sus estudios sobre la flora epifítica del olivo y de la adelfa, compararon, entre otros aspectos, la actividad criógena de 60 cepas aisladas. De ellas, sólo tres resultaron INA+. Con este resultado concluían qué, probablemente, la sensibilidad al frío del olivo y de la adelfa no debería imputarse a la presencia de núcleos biológicos de condensación de hielo. Conviene destacar que este trabajo

ha sido realizado en el sur de Italia, en localidades alrededor de Bari, en la costa Adriática, recogiendo las muestras en mayo, junio y julio, sin tener en cuenta las variaciones estacionales a que se ven sometidas las poblaciones de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

En cuanto a la base molecular de la actividad criógera en *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola* y *Pseudomonas fluorescens*, se sabe que está asociada a la bacteria intacta; no se detecta en productos extracelulares.

Hay trabajos que indican que se encuentra ligada a la membrana externa de estas bacterias gram-negativas (Sprang et al. 1981). Según estas investigaciones, sería un material sensible a proteasas y agentes que desnaturalizan las proteínas, lo que sugeriría la participación de alguna proteína de la membrana externa. Según Kozloff et al. (1983), la actividad criógena sería reducida por agentes que reaccionan con carbohidratos. Este mismo equipo (Kozloff et al. 1984) concluyó que dicha actividad, localizada en la pared, tendría dos componentes: uno de ellos sería una proteína con un grupo sulfhídrido, termolabil y sensible a proteasas y el otro componente fué identificado como fosfatidilinositol. Mientras que este último ha sido bien caracterizado, la proteína no se conoce.

Teniendo en cuenta que los compuestos lipídicos más abundantes en la membrana externa de la pared Gram-negativa son los lipopolisacáridos (LPS), cabría plantearse si el fosfatidilinositol forma parte del Lipido A de dichos LPS. En

el caso de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, el LPS ha sido analizado con detalle por Santaolalla y Cañas (1983), sin encontrarse fosfatidilinositol.

La información genética que hace a una bacteria INA+ en cepas de *Pseudomonas syringae* y *Erwinia herbicola* ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli* (Orser et al. 1982 y 1983). La expresión de esta característica en *E.coli* era similar, cualitativa y cuantitativamente, a la cepa de la que procedía el DNA. Esta información genética podía ser clonada en un simple fragmento de restricción, por lo que cabría deducir que no se trataba de una serie de genes dispersos por el genoma y que un número limitado de genes, de uno a cinco, eran suficientes para determinar el fenotipo INA+.

Finalmente, como consecuencia del establecimiento de la relación entre los daños por heladas y bacterias epifitas, se están investigando métodos de control de las bacterias INA+ en tres campos de trabajo: uso de bactericidas, utilización de bacterias INA- que tengan carácter antagónico con las INA+, e inhibidores de los núcleos de hielo.

5.3. Factores de patogeneidad y virulencia..

Como factores de patogeneidad y virulencia, muchas bacterias fitopatógenas, entre ellas *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, producen auxinas, fitotoxinas y citoquininas (Wood 1972, Wakimoto 1977)

5.3.1. Producción de auxinas.

Las hormonas vegetales regulan muchos procesos

biológicos en plantas superiores, como crecimiento y alargamiento celular, diferenciación de tejidos especializados, y la inducción de la síntesis de proteínas (Darnell 1986). Las hormonas de plantas puede ser divididas en cinco clases principales: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno.

Entre las auxinas, la más conocida es el ácido indol-3-acético (Figura 11), y ésta es precisamente la que interesa en este trabajo, puesto que se sabe ya desde hace mucho tiempo (Beltrá 1959 y Magie et al. 1963) que es producida por *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

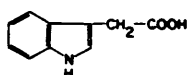


Figura 11. Acido indol-3-acético.

El modo de acción de ácido indol-3-acético no ha sido dilucidado en todas sus aspectos. Se conoce el efecto en la elongación celular, por ejemplo, en el tallo de una planta que acaba de germinar y está creciendo, el alargamiento celular está restringido a una zona justo bajo el ápice. La elongación y crecimiento del tallo es causada por el alargamiento de células en una dirección. El ácido indol-3-acético (AIA) induce una salida localizada de protones de la célula, que produciría aflojamientos en dichas localizaciones. (Figura 12). A nivel

molecular, parece ser que la auxina activa, directa o indirectamente, una bomba de protones ligada a la membrana con el resultado de una bajada de pH de 7.0 a 4.5. Como consecuencia de esta bajada de pH, se reducirían los puentes de H entre las fibrillas de celulosa de la pared. La bajada de pH podría también activar enzimas en la pared celular que degradasen varios constituyentes proteicos o polisacáridos, contribuyendo a un ablandamiento localizado de la pared. Debido a la elevada presión osmótica interna, la célula se alargaría en dirección a esas zonas más relajadas (Vanderhoeft et al. 1981).

La otra función de la auxina es su influencia sobre la síntesis de RNA y proteínas. Hay evidencias (Theologis 1986) que indican que la auxina suprime la síntesis de unas pocas proteínas, y sus m-RNAs, mientras que induce específicamente la síntesis de otras proteínas. Muchos de estos niveles alterados pueden ser detectados a las 4 horas, tiempo relativamente corto en comparación con otros resultados inducidos por la auxina, incluyendo la división celular, que no son detectados hasta las 12 horas.

La producción de AIA en plantas es necesaria para su normal desarrollo. En condiciones normales se necesitan sólo pequeñas cantidades y los mecanismos de regulación de las plantas aseguran que su producción y liberación hacia los sitios de actuación ocurra guardando relación con las necesidades de desarrollo.

En la enfermedad, la secreción de fitohormonas por el patógeno efectúa un cortocircuito en los sistemas de regulación

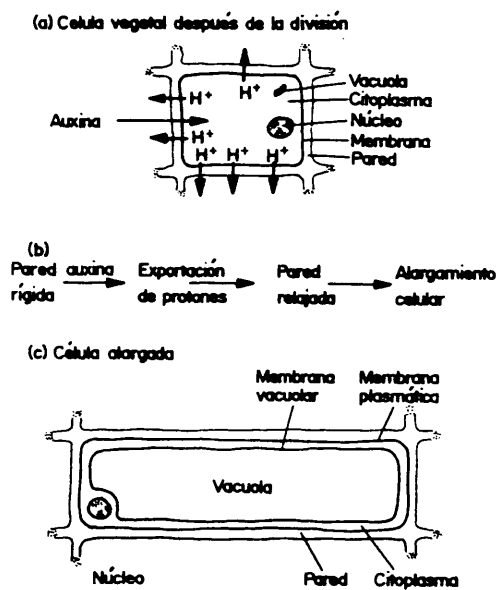


Figura 12. Estimulación del alargamiento celular por el AIA. La hormona produce un relajamiento local en la pared. La toma de agua por la vacuola crea una turgencia que hace que la membrana se expanda contra la pared, alargándose la célula. El incremento del tamaño celular es principalmente debido al aumento de la vacuola; la cantidad de citoplasma es constante. (De Darnell 1986).

normales del huesped. El desequilibrio de fitohormonas produce una proliferación indeferenciada en los tejidos del huesped (Kosuge et al. 1985).

La producción de AIA no es exclusiva de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, también se da en otros patotipos de la especie, en *Agrobacterium tumefaciens* (Yamada et al. 1985), *Azotobacter Vinelandi* (Garcia-Tavares et al. 1987), *Rhizobium* spp, *Bradyrhizobium japonicum* y otras bacterias de la rizosfera (Hunter 1987, Loper et al. 1986), *Xanthomonas* spp. (Lavermicola et al. 1987), etc. Pero, al contrario de lo que ha ocurrido con otras características de la especie, la producción de AIA ha sido estudiada preferentemente en *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

La síntesis de AIA en *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* se produce a partir de L-triptófano y es catalizada por dos enzimas: triptófano 2-monooxigenasa, que descarboxila triptófano para dar indolacetamida, e indolacetamida hidrolasa, que rompe la indolacetamida en amociaco y AIA (Kosuge et al. 1966). (Figura 13)

El estudio de la genética del proceso comenzó cuando Comai y Kosuge (1980) se plantearon localizar los genes, averiguando si tenían localización cromosómica o extracromosómica. Por tratamiento con naranja de acridina se obtenían bacterias que no producían triptófano 2-monooxigenasa, indolacetamida hidrolasa y AIA. Esta deficiencia se correlacionó con la pérdida de un plásmido de peso molecular 34×10^6 . Este plásmido, al que se llamó pIAA1, podía ser introducido en

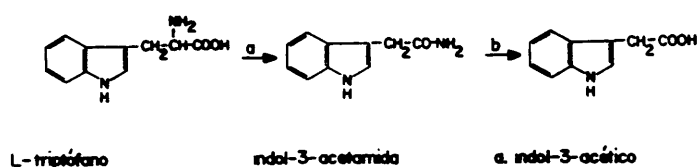


Figura 13. Síntesis de AIA a partir de L-triptófano.
a: triptófano 2-monooxigenasa. b: indolacetamida hidrolasa.

mutantes Iaa- por transformación, restaurándose así las actividades triptófano 2-monooxigenasa, indolacetamida hidrolasa y la producción de AIA.

El aislamiento de mutantes no productores de AIA se realizaba siguiendo la técnica de Smidt y Kosuge (1978), consistente en seleccionar las cepas por su resistencia a 5 metil triptófano. En la cepa salvaje, el 5-metil triptófano era oxidado por la triptófano 2-monooxigenasa, probablemente a 5-metil indolacetamida, destoxificando el producto, ya que ni la 5-metil indolacetamida ni el 5-metil-AIA inhibían el crecimiento de la cepa salvaje de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, los mutantes, por el contrario eran inhibidos por el análogo del triptófano. La selección, por tanto, se podía hacer sembrando en medio sin 5-metil triptófano, haciendo réplicas en medio con 5-metil triptófano y tomando las colonias que habían crecido en el primer medio y no en el segundo.

Los genes correspondientes a la triptófano 2-monooxigenasa, *iaaM*, y a la indolacetamida hidrolasa, *iaaH*, fueron mapeados y clonados por Comai y Kosuge (1982), resultando ser parte de un operón en el plásmido *pIAA1*.

Para comprobar si siempre se producía el AIA en cepas portadoras del mismo plásmido, Comai, Surico y Kosuge (1982), hicieron un muestreo con doce cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* procedentes de adelfa, olivo y aligustre. Dos cepas de adelfa procedentes de Italia presentaban un plásmido diferente, *pIAA2*, de 73 kb (*pIAA1*, de 52 Kb, procedía de cepas de adelfa de California) con distintos fragmentos de digestión con Eco RI, excepto en la región de los genes que codificaban el AIA. Posteriormente (Kosuge et al. 1985) se encontró otro plásmido, *pIAA3*, de 70 Kb, en cepas de adelfa de California. Por el contrario, en cepas de olivo y aligustre, los genes correspondientes a la producción de AIA, parece ser que tienen localización cromosómica (Kosuge et al. 1985), encontrándose homología por hibridación entre *pIAA1* y fragmentos cromosómicos de cepas de olivo, aunque limitados a 5-6 Kb de los genes *iaaM* e *iaaH*.

Otra diferencia notable entre las cepas procedentes de adelfa y las procedentes de olivo, es que las primeras son capaces de convertir el AIA en 3-indol-acetil- γ -L-lisina (AIA-lisina) cuando crecen en presencia de AIA (Hutzinger y Kosuge 1968). El gen correspondiente a la AIA-lisina sintetasa, *iaaL*, se encontró en el plásmido *pIAA1* buscando mutantes por delección. El locus *iaaL* se pudo clonar en *Escherichia coli*

(Glass y Kosuge, 1986). Las cepas procedentes de olivo, por el contrario, no producen el conjugado y pueden acumular grandes cantidades de AIA. Se apunta la posibilidad de que la formación del conjugado podía ayudar a controlar el AIA libre en la célula y la cantidad de AIA excretada al tejido del huesped.

Evidence et al. (1986) aislaron otro metabolito procedente de AIA, el α -N-acetil-indol-3-acetil- ϵ -L-lisina, obtenido a partir de cultivos en medio líquido de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (cepa de adelfa). Comprobaron los efectos fisiológicos en la elongación del hipocotilo de trigo, clorosis de hojas en adelfa y judía y respuesta hipertrófica en discos de patata, comparando con los que producía el AIA. Los resultados indicaban que el derivado era un 60% menos activo que el AIA. Dicho metabolito tampoco se encontraba en cepas de olivo.

Entre las especies bacterianas, citadas anteriormente, que también producen AIA, debemos destacar el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, en cuyos plásmidos Ti se han encontrado regiones de homología con los genes *iaaM* e *iaaH* de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Yamada et al. 1985 y 1986).

Finalmente, hay que destacar la gran heterogeneidad de métodos para la cuantificación del AIA, por lo que es muy difícil la comparación de resultados de diferentes autores.

En primer lugar, todos los métodos se basan en diferentes extracciones y largos procesos de laboratorio hasta que la muestra está preparada para el análisis en sí. Las extracciones se pueden hacer con eter dietílico (Guinn et al.

1986), acetonitrilo y cloroformo (Majcherczyk et al 1986), acetona y eter dietílico (Fackler et al. 1986), acetato de etilo (Fett et al., García-Tabares et al. 1987).

Según el método de análisis, a veces, una vez extraído el AIA es necesario derivatizarlo mediante una reacción química: formación del éster metílico del AIA para análisis por cromatografía de gases o espectrometría de masas (Vine et al. 1987), condensación de AIA con anhídrido acético en medio ácido para dar indol- α -pirona y medir por fluorimetría (Heredía et al. 1986), derivatizando con bis-(trimetil-silil)-trifluoroacetamida para cromatografía de gases (Hunter. 1987). También se ha utilizado el método ELISA, preparando previamente anticuerpos ante un antígeno artificial hecho introduciendo AIA en una proteína conjugada (Pence y Caruso. 1987).

Entre los métodos más simples y, por tanto, más usados, que no necesitan derivatización, se han empleado: el método colorimétrico de Gordon y Weber (1951), que se sigue utilizando hasta nuestros días (Lavermicola et al. 1987 b), y la cromatografía líquida (HPLC). Tanto uno como otro van precedidos de un procedimiento de extracción variable según los autores.

Si consideramos que el AIA es rápidamente descompuesto por la luz (Jackson y Mc Wha. 1983), que toda extracción, ineludiblemente, arroja pérdidas del producto, que algunas de las extracciones utilizadas son múltiples y de muchas horas de realización, habría que pensar en desarrollar métodos de análisis más rápidos y seguros.

5.3.2. Producción de fitotoxinas.

Erikson y Montgomery (1945) fueron los primeros que constataron que la sintomatología de una enfermedad cancerosa en el ciruelo (*Prunus silicina* Lindl.), producida por *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (antes *P. mors-prunorum* Wornald), era debida en parte a un factor tóxico que ellos consideraban una "endotoxina proteinacea" que aparecía en los filtrados del cultivo de la bacteria. Observaron que dichos filtrados producían severos daños sólo en tejidos de una variedad de ciruelo sensibles a la enfermedad y no en tejidos de una variedad resistente. Por aquella época no fué obtenida ni purificada dicha toxina, ni tampoco se logró explicación de sus efectos diferenciales en los tejidos del ciruelo.

Los trabajos de Sinden y De Vay (1967), y De Vay et al. (1968), llevaron a la purificación parcial de una toxina, con un amplio espectro de actividad antibiótica, o partir de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, la misma bacteria del caso anterior, pero obtenida a partir de melocotón (*Prunus persicae*). La inespecificidad antibiótica era tal que la fitotoxina, a la que se denominó Siringomicina, inhibía a seis especies de bacterias, cuatro especies de hongos, un alga unicelular y una especie de *Daphnia*. (Sinden et al. 1971). El organismo más sensible al antibiótico era *Geotrichum candidum*, inhibido completamente por 24 µg. de Siringomicina por ml.

El primer intento de purificación total y caracterización de la fitotoxina fué hecho por Sinden et al. (1971). La bacteria era cultivada en medio sólido (Potato

Dextrose Agar. Difco con 0.4% de Casaminoácidos) cubierto con una capa de celofán e incubada 5 días a 24°C. El celofán se retiraba y se hacían extracciones con acetona al 50% en agua acidificada con HCl, seguidas de extracciones con n-butanol, se desecaba y purificaba por cromatografía en columna de carboximetilcelulosa y cromatografía sobre papel. Así se aisló un compuesto que reaccionaba con ninhidrina y que coincidía con la actividad antibiótica. Por hidrólisis ácida y cromatografía bidimensional sobre papel se encontró que la Siringomicina era un péptido constituido por fenilalanina, lisina, valina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, serina, alanina y un aminoácido desconocido.

Todas las cepas toxigénicas de *P. syringae* que se fueron analizando producían la misma toxina, excepto una procedente del limón (Citrus), cuya toxina, a la que se llamó Siringotoxina, se parecía a la Siringomicina en su solubilidad en disolventes polares, su reactividad con ninhidrina, su inactivación a pH 12, y su naturaleza peptídica. Sin embargo la Siringotoxina era diferente en su baja afinidad en resinas catiónicas de carboximetil celulosa, sus valores Rf en cromatografía de capa fina y en su movilidad electroforética. Tras la purificación en electroforesis preparativa se hizo el análisis de aminoácidos, identificados como treonina, serina, glicina, ornitina y un aminoácido básico desconocido, igual al de Siringomicina (Gross y De Vay. 1976).

En análisis posteriores de Gross et al. (1977 d), los hidrolizados proporcionaban resultados diferentes. La

Siringomicina contenía serina, fenilalanina, un aminoácido básico no identificado y arginina, en proporciones 2:1:2:1. La Siringotoxina daba treonina, serina, glicina, ornitina y el mismo aminoácido no identificado en proporciones equimoleculares.

Desde entonces se han mejorando los medios para la producción de fitotoxinas, así como las condiciones que la regulan. En los primeros trabajos de Gross et al. (1977 b y c) se comparaba la producción de Siringomicina en Caldo Nutritivo, Caldo MB, y PDB Difco, adicionando o no en cada caso glucosa y Casaminoácidos en diferentes proporciones, en agitación o en reposo, y modificando las condiciones de pH y temperatura. Las mejores condiciones resultaron en PDB suplementado con 1.5% de D-glucosa y 0.4% de Casaminoácidos, en cultivo en reposo a 23 - 25° C.

Gross (1985) volvió a revisar las condiciones para la producción de Siringomicina basándose en que muchas bacterias productoras de antibióticos los excretan como metabolitos secundarios, teniendo una función de destoxificación celular. La regulación de dichos metabolitos secundarios era llevada a cabo por elementos traza específicos, fosfato inorgánico, hierro, temperatura y pH. Los medios que preparó fueron los siguientes :

-PDB, preparado de acuerdo a Gross y De Vay (1977 b), eliminando el hierro con 8-hidroxiquinolina, e incorporando luego hierro (Fe Cl_3) en cantidades medidas de 0, 0.137, 0.27, 0.54, 1.35, 2.7, 13.5 y 27 mg/l. (0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{mol/l}$).

-SRM (Siringomicina Mínimo), un medio sintético que contenía 1.0% de D-glucosa, 0.4% de L-histidina, 197.2 mg/l de $Mg\ SO_4 \cdot 7H_2O$, 128mg/l de una solución de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 (0.5:0.5 mol/l) y 2.7 mg/l de $Fe\ Cl_3$.

- SRM-M (SRM Modificado), igual que el anterior pero modificando la concentración final de fosfato potásico a 32.1 mg/l.

Antes de llegar a la formulación de estos últimos medios sintéticos hubo que experimentar con varias concentraciones de todos los ingredientes.

Con la utilización de estos medios se estableció que el hierro regulaba la producción de Siringomicina. La incorporación de 2 ó más $\mu mol/l$ de $Fe\ Cl_3$ en PDB sin hierro, proporcionaba en algunas cepas hasta 1024 unidades/ml. de Siringomicina, mientras que sin hierro daba sólo 16 unidades/ml. Entre 0.5 y 1.0 $\mu mol/l$ de $Fe\ Cl_3$, la concentración de hierro y Siringomicina eran directamente proporcionales, y de 2 $\mu mol/l$ de $Fe\ Cl_3$ en adelante, la concentración de hierro no aumentaba ni inhibía la producción. De esta forma se llegó también a la formulación de los medios sintéticos señalados anteriormente, constatándose que la L-histidina era un aminoácido fundamental para la producción de la fitotoxina, así como la concentración de fosfato.

Los estudios sobre el modo de acción de la Siringomicina comenzaron cuando Penner et al. (1969) observaron que la fitotoxina se unía al DNA de *Geotrichum candidum* inhibiendo la RNA polimerasa en extractos libres de células.

Backman y De Vay (1971) confirmaron estos resultados, aportando evidencias de que dicha inhibición podría ocurrir in vivo. Estos mismos autores, demostraron la inhibición de la síntesis del RNA aún cuando ésta no sea DNA-dependiente, como en los casos del Virus del Mosaico del Tabaco y del fago MS-2 de *E. coli*, ambos con genoma de RNA-mc de sentido positivo (Matthews, R.E.F. 1984).

Al tratarse de un antibiótico polipeptídico, Backman y De Vay, trataron de aplicar las mismas técnicas que se habían utilizado en el estudio del modo de acción de antibióticos de similar naturaleza. El efecto sobre la tensión superficial se podía visualizar depositando gotas de 25 μ l de diluciones de Siringomicina en agua sobre la superficie de placas Petri de poliestireno. Las gotas correspondientes a concentraciones tóxicas tenían ángulos de contacto, según observación visual, menores de 90°, mientras que las gotas de concentraciones no tóxicas presentaban ángulos de contacto de más de 90°.

Esta acción sobre la tensión superficial sugería que la Siringomicina podría actuar sobre la membrana de las células sensibles. Utilizando el método de Kinsky (1962), en cultivos de *Geotrichum candidum* incubando con dosis subletales de Siringomicina, se podía detectar un incremento de la absorbancia a 260 nm. en el medio de cultivo filtrado, lo que indicaba pérdida de componentes celulares como consecuencia de los cambios en la permeabilidad de la membrana. Este mismo efecto se pudo demostrar sobre eritrocitos de conejo lavados, que perdían hemoglobina al ser tratados con Siringomicina.

La microscopía electrónica vino también a confirmar el efecto de la Siringomicina sobre las membranas viéndose alteradas tanto la membrana plasmática y la envoltura nuclear, como las membranas mitocondriales (Surico et al. 1982).

A partir de estos primeros estudios, la mayoría de los investigadores consideraron que la inhibición de la síntesis del RNA era, probablemente, un modo de acción secundario, por lo que sus investigaciones se han centrado sobre la acción de la Siringomicina en las membranas de diferentes organismos. Así, Zhang et al. (1986) demuestran el efecto de la fitotoxina sobre la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*, y sobre la membrana de *Rhodotorula pilimanae* (mismos autores, 1987) concluyendo que inhibía el crecimiento celular alterando el potencial eléctrico y la diferencia de pH a través de la membrana, y estimulando el bombeo de protones de la ATP-asa.

Reidl et al. (1987) y Bidwai et al. (1987 a y b), inciden de nuevo sobre el tema y en las conclusiones, pero estudiando ya el efecto sobre membranas vegetales (maíz y remolacha) y no sólo sobre levaduras. Estos últimos autores, al referirse al incremento de la actividad ATP-asa en la membrana sugieren que no se debía a una alteración de los gradientes iónicos, sino por efectos de regulación o modificación covalente del enzima.

También se han hecho estudios sobre el efecto de la Siringomicina sobre las plantas (Surico y Iacobellis 1977, Seemueller 1980), principalmente por inoculación sobre hojas, detectándose no sólo la necrosis que produce sino también su

acción sobre las membranas y los cloroplastos. Previamente Gross y De Vay (1977 a) ya habían demostrado en algunas cepas de *Pseudomonas syringae* causantes del moteado del maíz, que todas las que producían necrosis en los tejidos de la planta eran también productoras de Siringomicina en medio artificial, mientras que las cepas no productoras de Siringomicina no causaban necrosis. No obstante, no se detectaban diferencias significativas en cuanto a la multiplicación en los tejidos del huésped entre las cepas productoras y no productoras de Siringomicina. Painter y Alconero (1979), prepararon anticuerpos marcados con fluoresceína frente a Siringomicina para detectar la toxina en plantas infectadas. Los tallos y hojas de melocotón inoculadas con *Pseudomonas syringae* o con Siringomicina presentaban la fluorescencia típica verde-amarillenta del marcador en todos los tejidos infectados o infiltrados, lo que no ocurría en las plantas de control sanas. La mayoría de la fluorescencia se observaba en la periferia de las células, y se detectaba en xilema, floema, cambium y parénquima medular.

En los primeros estudios genéticos de González y Vidaver (1978, 1979 y 1980), se asocia la producción de Siringomicina con la presencia de determinados plásmidos. Curando de plásmidos la cepa HS 191 de *Pseudomonas syringae*, patógena del maíz, y comparando esta cepa con la cepa sin curar, se demuestra una asociación entre la presencia del plásmido, llamado pCG131, y producción de Siringomicina, resistencia a la bacteriocina PSC-1B y a los fagos Psp 1 y Psy 4A. Comparando plásmidos de cepas procedentes de mijo, almendro y albaricoque,

todas producían siringomicina y contenían un sólo plásmido de unos 35 Md que por tratamiento con EcoRI daba, en los tres casos, un fragmento de 1.3 Md. Aparte de esta característica en común, los tres plásmidos presentaban diferentes fragmentos de digestión con endonucleasas.

En estudios posteriores (Gross y Vidaver 1981), intentaron la transformación de cepas no productoras de Siringomicina que no contenían plásmidos detectables, o cepas curadas de pCG 131, utilizando dicho plásmido, pero no se consiguieron los resultados esperados. Currier y Morgan (1983), analizaron en 40 cepas la presencia de plásmidos. De 21 cepas que producían Siringomicina, sólo 9 contenían plásmidos. De 10 que producían Siringotoxina, todas contenían, al menos, un plásmido. Eliminando los plásmidos de dos cepas productoras de Siringomicina, no se afectaba ni la producción de la fitotoxina ni la patogeneidad. Finalmente, González et al. (1984) llegaron a la conclusión de que las cepas desprovistas de plásmido pCG 131 aún producían Siringomicina, y que las cepas receptoras no productoras no se transformaban al adquirir el plásmido. Por tanto, es muy poco lo que se sabe acerca de la genética de la síntesis de la fitotoxina.

5.3.3. Producción de Citoquininas.

Desde 1935, Wilson ya sospechaba, en base a sus estudios morfológicos, que había dos agentes implicados en la sintomatología de la tuberculosis del olivo, de los cuales uno induciría hipertrofia y otro induciría la hiperplasia.

El descubrimiento de que *Pseudomonas syringae* pv.

savastanoi producía citoquininas se debe a Surico et al. (1975). Haciendo extractos en acetato de etilo de filtrados de cultivos de la bacteria, cromatografiaban en capa fina y hacían ensayos biológicos, obteniendo unas actividades citoquininas similares a la iso-pentenil adenina e iso-pentenil adenosina de *Agrobacterium tumefaciens*.

El mismo equipo de Surico (1985 a,b,c), estudió las relaciones entre la producción de AIA y citoquininas en cultivo, así como la patogeneidad, en cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* procedentes de olivo, adelfa y sus mutantes α -metil triptófano resistentes. Las cepas salvajes producían AIA y citoquininas en diferentes proporciones. Las α -metil triptófano-resistentes producían poco o nada de AIA y la misma cantidad de citoquininas que sus progenitoras. La citoquinina aislada por este equipo fué identificada, en base a datos espectroscópicos, como 1" metil-trans-zeatina ribósido. (Figura 14)

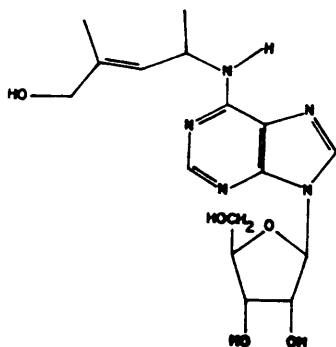


Figura 14. Estructura de la citoquinina aislada de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

La identificación de esta citoquinina ha sido confirmada, así como la obtención de otros derivados metilados, como 1"-metil zeatina y 1"-metil dihidro zeatina ribósido (Morris.1986).

La construcción de genotecas de plásmidos de la bacteria ha permitido la localización de un gen, llamado "ptz", que codifica la síntesis de citoquininas. La expresión de "ptz" en *Escherichia coli* producía la secreción de zeatina, zeatina ribósido, iso-pentenil adenina e iso-pentenil adenosina. También se ha podido demostrar una considerable homología funcional entre "ptz" y los genes "tzs" e "ipt" de *Agrobacterium tumefaciens* (Morris et al. 1986).

5.4. Importancia económica de la enfermedad.

A pesar de ser los países mediterráneos los principales productores de aceituna y, por tanto, los principales afectados a nivel económico, no se ha desarrollado ningún trabajo a nivel regional que evalúe cuantitativamente los daños de la enfermedad. En todos los trabajos sobre el tema únicamente se habla de una evidente pérdida de vigor en los árboles fuertemente atacados por la tuberculosis.

El único trabajo cuantitativo sobre el tema es el de Schroth et al. (1973) en California. Estos investigadores han encontrado que la producción media de aceitunas en árboles que tienen de 0.1 a 0.3 tumores por 0.3 m. de rama frutal, a lo que ellos llaman infección ligera, es de 121.3 Kg, mientras que los árboles que tienen de 0.51 a 1.0 tumores por 0.3 m., infección

moderada, producen 94.6 Kg. Los autores concluyen, aportando datos económicos, que las pérdidas por acre de tierra deben ser de 403.38 dólares, naturalmente, según el precio de la aceituna en California y del valor del dólar en 1973.

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los objetivos del trabajo de investigación a realizar los podemos resumir en los siguientes puntos:

1. El estudio cualitativo de la flora bacteriana asociada a los tumores inducidos por *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, no sólo en *Olea europaea*, sino también en otras plantas afectadas por la misma enfermedad. Este estudio comprende también el establecimiento de los medios de cultivo y los métodos más adecuados al fin.

2. Analizar la variabilidad de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* aisladas a partir de tumores de varias plantas, a partir de la flora epifítica y a partir de los parásitos asociados a la enfermedad.

3. Analizar la variabilidad de otras bacterias presentes en la flora tumoral junto con *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, tratando de clasificar dichas bacterias puesto que, según hemos expuesto en la Introducción, las denominaciones y taxonomía son confusas.

4. Establecer relaciones entre *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* con los parásitos del olivo, con los métodos de recolección de la aceituna, con las heladas y con las variaciones estacionales de humedad y temperatura.

5. Estudiar las variaciones estacionales, a nivel numérico que se producen en la flora epifítica del olivo, para poder relacionarlas con los ataques de la enfermedad.

6. Contribuir al conocimiento de la Anatomía. Histología y Citología de la enfermedad.

7. Estudiar la producción de metabolitos (ácido indol-3 - acético y siríngomicina), tratando de establecer cuáles son las condiciones ideales de producción mejorando, en lo posible, la detección y cuantificación de dichos productos.

III. MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. La zona olivarera 6 o Centro

Constituida por comarcas de las provincias de Avila, Madrid, Toledo, Ciudad Real, Cuenca, Guadalajara y Albacete. Contiene una superficie de olivar de 359.019 Ha., dedicada toda ella a aceituna de almazara, con una producción de 231.202 Tm. de aceituna, que proporcionan 51.519 Tm de aceite.

En esta zona, el olivar acusa ostensiblemente la sequía, que proviene de la baja pluviosidad en los meses de Febrero, Marzo, Abril, Julio, Agosto y Septiembre. (Puerta et al. 1972)

1.2. La comarca de Navahermosa.

La comarca de Navahermosa es, tras la de Mora, la más olivarera de la provincia de Toledo, con una superficie de olivar de 20.500 Ha y con una producción media de aceite Kg/Ha de 219.36. Ocupa, por tanto, el tercer lugar en rendimiento de las 33 comarcas de la Zona 6, tras la de Hellín (261.30 Kg/Ha) y la de Mora (225.84 Kg/Ha.)

No sólo es importante el rendimiento obtenido en la comarca, sino también la gran calidad del aceite, como lo demuestra el hecho de que, según el Anuario de Estadística Agraria 1985 (M.A.P.A.), la provincia de Toledo es la única de la zona Centro en la que el 82.99% de su aceite es de calidad extra.

La localización geográfica y la extensión de la comarca de Navahermosa se pueden ver en el mapa de la provincia de Toledo (Puerta, C. de la, 1972). que aparece en la Figura 15.

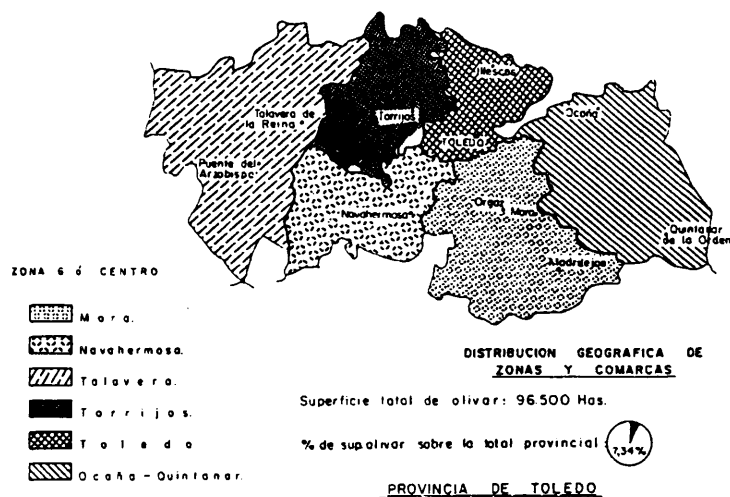


Figura 15. Distribución geográfica de las comarcas olivereras de la provincia de Toledo.

Dentro de la comarca, nuestro estudio lo hemos realizado en la llamada Raña de la Mascara, limitada por las coordenadas geográficas $4^{\circ} 28'$ y $4^{\circ} 32'$ de longitud Oeste y $39^{\circ} 38'$ y $39^{\circ} 42'$ de latitud Norte, situada entre las cuencas de los ríos Majadillas y Cedena. La localización la podemos ver en la Figura 16, en la que nos encontramos también el Esquema de Caracterización Agroclimática.

Los olivares de la comarca de Navahermosa podemos clasificarlos, según el conocimiento que nos ha dado el

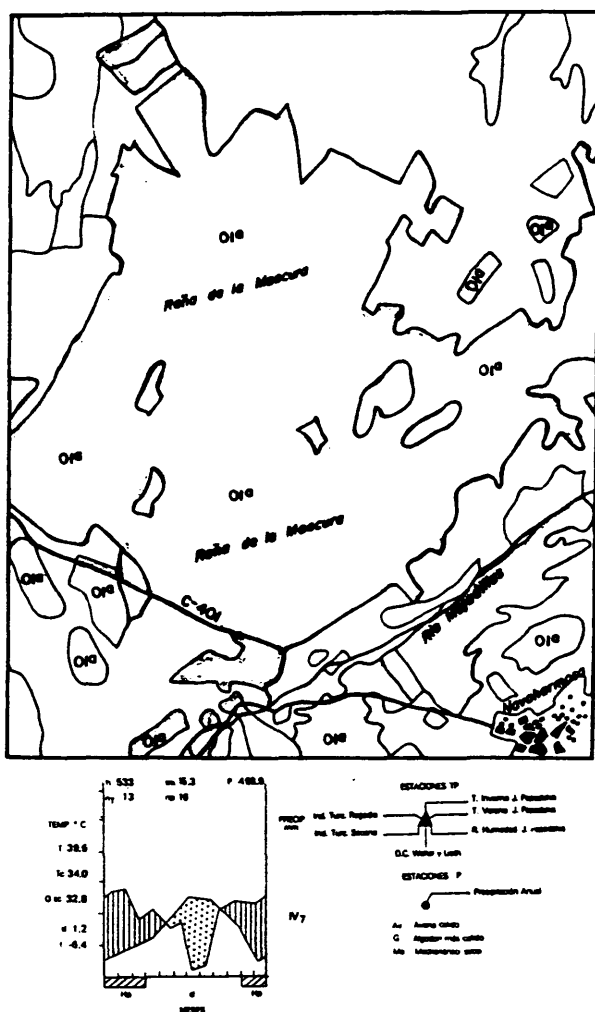


Figura 16. Mapa de Cultivos y Esquema de Caracterización Agroclimática de la Raña de la Mascara. Tomado de los Mapas de Cultivo y Aprovechamiento (E. 1:50.000), hojas 655, 656, 683 y 684. Ministerio de Agricultura. 1977.

continuo andar entre ellos, en dos tipos principales:

- Olivares de raña: La raña, palabra difícilmente encontrable en los diccionarios al uso, es un vocablo empleado en zonas de la provincia de Toledo y Extremadura para denominar mesetas, grandes planicies elevadas de terreno cultivable. Los olivares más importantes de la comarca de Navahermosa están situados en la Raña de la Mascara. Dichos olivares se encuentran sobre una superficial capa freática, cuyo nivel acusa mucho las variaciones climáticas, alcanzando la superficie en épocas de lluvias, y descendiendo hasta los 4-5 m. durante la estación seca. Ello trae como consecuencia la adaptación del sistema radicular paralelo al suelo. En este terreno se dan las producciones más altas de la comarca, de unos 20 kg. por pie. (Figura 17.)



Figura 17. Olivar de la Raña de la Mascara.

- Olivares de las estribaciones de los Montes de Toledo: Están constituidos por árboles de menor porte debido a las duras condiciones en que se desarrollan. La cantidad de suelo disponible es muy pequeña, teniendo que adaptar su sistema radicular a los accidentes del terreno. Favorece su desarrollo el hecho de que el suelo está completamente cubierto de grandes guijarros, con lo que se retiene la humedad en la estación seca. En este terreno la producción no suele sobrepasar los 10 kg. por pie. (Figura 18)



Figura 18. Olivar de las estribaciones de los Montes de Toledo.

Las variedades del olivo que se encuentran en la comarca de Navahermosa son:

- Cornicabra: Esta variedad constituye, practicamente, el 100% de los cultivos de la comarca. Sus árboles son de vigor medio. La forma curva del fruto es muy característica. De ahí el

nombre de la variedad, "cuerno de cabra". La madurez es tardía, dando frutos relativamente grandes y con buen rendimiento en aceite, siendo este de buena calidad. Se trata de una variedad especialmente sensible a la tuberculosis del olivo y a *Dacus oleae*. (Figura 19).



Figura 19. Variedad Cornicabra.

- Manzanilla toledana: Esta variedad, también denominada localmente Negrilla o Redonda, se cultiva aisladamente, encontrándose unos pocos árboles en el conjunto de un olivar constituido por Cornicabra. A veces se encuentran en el olivar en los llamados "entrelíneos", árboles que constituyen la linde de una finca a otra. Sus frutos son notablemente redondeados, siendo la producción muy baja. esta variedad es especialmente resistente a la tuberculosis del olivo. (Figura 20).

- Acebuche: Se trata del olivo salvaje, que crece



Figura 20. Variedad Manzanilla Toledana.

espontáneamente. Normalmente se encuentra achaparrado y sin tronco, teniendo un aspecto espinoso. El fruto es seco, sin apenas mesocarpio. En la comarca de Navahermosa aparece en algunas manchas, como las que se dan en la cuenca del río Cedená. (Figura 21).

1.3. Cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

Las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* han sido obtenidas a partir de tumores en la naturaleza:

La cepa que denominaremos Ps1, fué obtenida en 1978 a partir de tumores de *Olea europaea* L., variedad Cornicabra, en la comarca de Navahermosa.

La cepa Ps2, se aisló en 1986 en la misma comarca y en la misma variedad de olivo.

La cepa Ps3, aislada en 1986, en las mismas condiciones y localización que la anterior, diferenciándose en



Figura 21. *Olea europaea* var. *sylvestris* o acebuche.

una mayor fluorescencia en el Medio B de King.

La cepa Ps4, aislada en 1978 a partir de tumores de *Olea europaea* var. *sylvestris*. Brot., en la zona de acebuches existente en el Rio Cedená.

La cepa IF3026, cedida por Elena Alonso del Instituto de Fitopatología del C.S.I.C., procede de olivo de Benidorm (Alicante).

La cepa PsA, aislada en 1980 a partir de tumores de *Nerium oleander* L., en la Calle de Arturo Soria de Madrid.

La cepa PsF, aislada en 1980 de tumores de *Fraxinus excelsior* L., existentes en la ribera del Rio Cedená.

La cepa PsR, aislada en 1980 a partir de tumores de *Retama sphaerocarpa* L. en la zona del Rio Cedená.

1.4. Cepas de otras bacterias asociadas a la tuberculosis del olivo.

Como citábamos en la Introducción, apartado 5.2.4., se pueden detectar otras bacterias junto a *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* en los tumores, que habían sido denominadas por última vez *Agrobacterium luteum* (Babes) Hellmuth. 1956. Pues bien, para comparar las bacterias que acompañan a *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* en los tumores, en los parásitos del olivo y en su presencia como epífita, hemos utilizado las siguientes cepas:

Agrobacterium tumefaciens, cepa C58, proporcionada por R. Beltrá, procedente del Laboratorio de Genética de la Universidad de Gante (C.E.C.T. 90).

Agrobacterium tumefaciens, cepa G88, proporcionada también por R. Beltrá, con la misma procedencia que la anterior, no incluida en el catálogo de Cepas (1985) de la C.E.C.T.

Agrobacterium tumefaciens, a la que denominaremos cepa V, obtenida a partir de tumores de vid en la provincia de Toledo por R. Beltrá.

Erwinia carotovora var. *atroseptica* (C.E.C.T. 314, N.C.P.P.B. 549), actualmente clasificada en el Bergey's Manual (1984) como subespecie *atroseptica*.

Erwinia carotovora var. *carotovora* (C.E.C.T. 225, N.C.P.P.B. 312), también clasificada hoy como subespecie *carotovora*.

Todas las demás cepas estudiadas en este trabajo, tanto de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* como de otras

bacterias relacionadas con ella han sido obtenidas en su habitat natural: tumores, flora -pífita, asociadas a *Dacus oleae* y suelo.

1.5. Plantas empleadas para pruebas de patogeneidad.

Las pruebas de patogeneidad se han hecho, principalmente sobre olivos de la Raña de la Mascara, en la comarca de Navahermosa (Toledo).

Ocasionalmente se han realizado también inoculaciones en *Nerium oleander*, *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicum esculentum*.

1.6. Medios de cultivo.

1.6.1. Medios para el aislamiento de bacterias

Agar nutritivo

Preparado según las instrucciones del fabricante (Pronadisa). Como es un medio general, no selectivo, en él crecen bien todas las cepas estudiadas y se puede emplear para análisis cuantitativos. Todas las cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas crecen en este medio, tras incubación a 25° C durante 48 h., produciendo colonias transparentes de, aproximadamente, 1 mm. de diámetro. Las cepas de bacterias que acompañan a *Pseudomonas*, producen colonias de unos 2 mm de diámetro, presentando color amarillo o blanco.

Agar Nutritivo con 1.5 g/l de Sales Biliares

Presenta las mismas características que el anterior,

el crecimiento de las diferentes bacterias es igual, pero con la ventaja de que las Sales Biliares inhiben el crecimiento de las Gram-positivas.

Agar Nutritivo con 25 mg/l de Cristal Violeta

Al igual que el medio precedente, se produce inhibición de las Gram-positivas, en este caso por el Cristal Violeta. Las cepas de *Pseudomonas* crecen todas, pero las colonias son más pequeñas que en los dos anteriores, con unos 0.5 mm de diámetro. Las bacterias que acompañan a *Pseudomonas* captan algo del colorante, por lo que se camufla su pigmentación.

Medio B de King (King et al. 1954)

Preparado según las instrucciones del fabricante (Biomérieux). En este medio crecen también todas las cepas estudiadas. Las cepas de *Pseudomonas*, en las mismas condiciones que en los medios anteriores, producen colonias de 1-2 mm. de diámetro, transparentes, exaltándose la producción de pigmentos fluorescentes. Las otras cepas acompañantes producen colonias muy mucosas y abombadas, de más de 5 mm. de diámetro. La producción de cápsula es tan abundante que llegan a gotear sobre la tapa de la placa. También aparecen con sus colores característicos amarillo o blanco.

Medio B de King con Antibióticos

Con la misma composición que el anterior, pero añadiendo Ampicilina a concentración de 10 μ g/ml. y Nistatina, 10.000 u/ml. Este medio es selectivo para *Pseudomonas syringae*,

por su resistencia a los Beta-lactámidos. Se puede emplear para detectar dicha bacteria en medios con flora mixta, como suelos y flora epifita, impidiéndose el crecimiento de mohos y levaduras por la Nistatina.

Medio D4 (Kado y Heskett 1970)

Según la definición de los autores es un medio selectivo para *Pseudomonas* fitopatógenas, con la siguiente composición:

Glicerol _____	10 ml.	
Sacarosa _____	10 g.	
Hidrolizado de caseína _____	1 g.	
NH ₄ Cl _____	5 g.	
Lauril sulfato sódico _____	0.6 g.	
Agar _____	15 g.	
Agua _____	1000 ml.	pH= 6.8

En este medio no crecen todas las cepas de *Pseudomonas*. Como ya señalan sus autores, el % de Eficiencia es muy bajo, del 6.5%, considerando dicho % como el número de colonias que crecen en el medio selectivo/número de colonias en medio no selectivo $\times 10^2$. Las pocas cepas de *Pseudomonas* que crecen en este medio no son un bajo % de las presentes en cada tumor, sino que, sólo crecen bacterias procedentes de determinados tumores, no creciendo ninguna del resto. Cuando se da dicho crecimiento, las colonias son de 1-2 mm. de diámetro, blancas convexas y mucosas. Las bacterias acompañantes de *Pseudomonas* producen colonias similares a las descritas en el

Medio B de King.

Medio D3 (Kado y Heskett 1970)

Es un medio selectivo para especies de *Erwinia*, con la siguiente composición:

Sacarosa _____	10 g.
Arabinosa _____	10 g.
Hidrolizado de caseína _____	5 g.
Li Cl _____	7 g.
Glicina _____	3 g.
Na Cl _____	5 g.
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O _____	0.3 g
Lauril sulfato sódico _____	0.050 g.
Azul de bromotimol _____	0.060 g.
Fucsina ácida _____	0.1 g.
Agar _____	15 g.
Agua _____	1000 ml. pH=6.9-7.1

Las especies de *Erwinia* crecen de una forma muy característica, dando una coloración roja al medio; la intensidad del color y el tamaño de las colonias depende de las especies. En este medio no crecen las cepas de *Pseudomonas syringae* ni *Agrobacterium tumefaciens*.

Medio D 1 (Kado y Heskett 1970)

Es un medio selectivo para *Agrobacterium*, con la siguiente composición:

Manitol _____	15 g.
Na NO ₃ _____	5 g.

Li Cl _____	6 g.
Ca (NO ₃) 4 H ₂ O _____	0.020 g.
K ₂ H P O ₄ _____	2 g.
Mg S O ₄ 7 H ₂ O _____	0.2 g.
Azul de Bromotimol _____	0.1 g.
Agar _____	15 g.
Agua _____	1000 ml. pH 7.2

Agrobacterium tumefaciens crece en este medio produciendo colonias azul o azul-verdoso. No es completamente selectivo, pues en él pueden crecer las especies de *Erwinia*, con una eficiencia similar al medio D4, produciendo colonias de diferente tamaño, según las especies, de color amarillo por la acidificación. También puede crecer *Pseudomonas syringae* con eficiencia parecida a la del medio D4, produciendo pequeñas colonias azules.

1.6.2. Medios de cultivo para antibiogramas.

Agar Glucosado con Patata

En un medio de cultivo para mohos y levaduras compuesto por:

Patata (infusión de) _____	200 g.
Glucosa _____	20 g.
Agar _____	15 g.
Agua _____	1000 ml.

Empleado para cuantificar la acción de la siringomicina sobre *Geotrichum candidum*, según el método de

Sinden et al. (1971). En este caso hemos empleado Bacto-Potato Dextrose Agar de Difco.

Este mismo medio, pero preparado a partir de patata natural se ha utilizado para la producción de Siringomicina en medio sólido.

Agar de Mueller Hinton

Es el clásico medio de cultivo para pruebas de sensibilidad a antibióticos y cultivo de microorganismos exigentes. Preparado según las instrucciones del fabricante (Pronadisa).

Este medio lo hemos empleado para hacer antibiogramas de diversas cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* a fin de poder elaborar un medio selectivo por adición de antibióticos.

También lo hemos utilizado para ensayar la sensibilidad de *Geotrichum candidum* ante la siringomicina, dando mejores resultados que el anterior por la mejor difusión de la fitotoxina en este medio.

1.6.3. Medios de cultivo para mohos y levaduras.

Agar Dextrosa Saboraud con Antibióticos

Es un medio recomendado para el aislamiento de mohos y levaduras. El Agar Dextrosa Saboraud se prepara según las instrucciones del fabricante (Pronadisa) y, tras su esterilización, poniéndolo en baño a 50-55°C, se añaden en condiciones de esterilidad Ampicilina y Estreptomycin hasta concentraciones de 150 y 125 $\mu\text{g/ml}$. respectivamente.

Este medio lo hemos empleado para el aislamiento de hongos asociados a la cochinilla del olivo, *Saissetia oleae*.

1.6.4. Medios de cultivo para la identificación y caracterización de bacterias.

Medio O-F de Hugh y Leifson

Preparado según las instrucciones del fabricante (Difco), es un medio clásico para conocer el tipo de metabolismo de las bacterias con respecto a los hidratos de carbono: oxidación o fermentación.

En el momento del uso, el medio debe ser desgasificado en baño maría, al menos durante 10 minutos. Como es un medio base sin hidratos de carbono, se añade el correspondiente hidrato de carbono esterilizándolo por filtración con filtro Millex-Memo Millipore de 0.22 μ m. de diámetro de poro, hasta dar una concentración final del 1%. Se deja enfriar en posición vertical.

El microorganismo se inocula por picadura central profunda en dos tubos. Uno de ellos se cubre con parafina neutra y esteril para evitar el contacto del cultivo con el aire.

Tras la incubación, de 24, 48, 72 ó más horas, según la cepa estudiada, los resultados posibles son los conocidos como: oxidación, fermentación, alcalinización y, a veces, aparecen microorganismos inactivos (Buttiaux et al 1974).

Este mismo medio lo hemos empleado con una modificación consistente en que, en lugar de añadir la solución filtrada del hidrato de carbono correspondiente, hemos puesto en

cada tubo un disco con el compuesto (Gluci-Discs. Biomerieux o Bacto Differentiation Disks Carbohydrates de Difco). En este caso no se trataba ya de conocer el tipo metabólico del microorganismo, sino que, una vez establecido éste, el método lo empleábamos para conocer la variedad de fuentes de Carbono que era capaz de utilizar.

Agar Hierro de Kligler

Este medio de cultivo, como el anterior, es un medio clásico para diferenciar bacilos Gram-negativos. Preparado y utilizado según las instrucciones del fabricante (Pronadisa), lo hemos empleado para diferenciar las colonias de bacterias obtenidas de la naturaleza, ya que *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, al no ser una bacteria fermentadora, deja el medio invariable, creciendo sólo en superficie. Por el contrario, el resto de la flora que acompaña a ésta en tumores, parásitos, etc. son bacterias fermentadoras de Glucosa.

Medio para detectar la Arginina dihidrolasa (Misaghi y Grogan. 1969)

La detección de la presencia de Arginina dihidrolasa es fundamental cuando se trata de diferenciar entre *Pseudomonas* con pigmentos fluorescentes procedentes de la naturaleza, ya que, según vimos en I.1.5.2, las bacterias de este género que son fitopatógenas son aquellas que dan negativa la Arginina dihidrolasa.

La composición del medio es la siguiente:

Peptona	_____	1 g.
Na Cl	_____	5 g.



K_2HPO_4 _____	0.3 g.
Agar _____	3 g.
Rojo fenol _____	0.001 g.
L (+) Arginina. H Cl _____	10 g.
Agua _____	1000 ml. pH=7.2

El medio se distribuye en tubos, a 3 ml. cada uno, y se esteriliza en autoclave. Los tubos se siembran en picadura y se sellan con parafina neutra y esteril para evitar el contacto con el aire.

Tras la incubación, de 1 a 4 días según las cepas, la existencia del sistema enzimático Arginina dihidrolasa se manifiesta porque el indicador de pH, rojo fenol, vira a color rojo púrpura, debido a que se libera amoníaco, en dos momentos del proceso, alcalinizándose el medio.

Caldo de Nitrato

Hemos empleado Bacto-Nitrate Broth (Difco), medio recomendado para comprobar la capacidad de las bacterias para reducir el nitrato a nitrito. Como este medio se emplea normalmente para pruebas de identificación de bacterias de crecimiento rápido (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* no fitopatógenas, etc.) tanto los fabricantes de medios de cultivo como los tratados prácticos de Bacteriología recomiendan una corta incubación (de 12 a 24 horas) debido a que, tras ese periodo de incubación, los nitritos podrían ser también reducidos hasta Nitrógeno molecular, dando una reacción falsamente negativa. En nuestro caso, como todas las bacterias estudiadas

son de crecimiento lento, hemos hecho incubaciones de 24 a 48 horas antes de revelar la prueba.

Para detectar la presencia de nitritos se añaden dos o tres gotas de una solución de ácido sulfanílico (0.8% en ácido acético 5N) y una cantidad igual de una solución de α -naftilamina (0.5% en ácido acético 5N). La reacción positiva se manifiesta por la aparición de un precipitado de color rosa a rojo ladrillo fuerte.

Gelatina Nutritiva

Utilizamos Bacto-Nutrient Gelatin (Difco) para demostrar la proteólisis por parte de las bacterias. La incubación, en este caso, debe ser de más de tres días. Como la temperatura de incubación es superior al punto de fusión de la gelatina, cada día es necesario enfriar los tubos para determinar si esta ha sido licuada.

Agar Almidón

Es Agar Nutritivo suplementado con un 1% de Almidón. Tras la siembra de incubación de la bacteria, se cubre la placa con una solución de Lugol. El almidón no hidrolizado se colorea de violeta. Las colonias de bacterias que hidrolizan el almidón aparecen con un halo claro. (Larpent et al. 1970).

Agar Citrato de Simmons

Preparado y utilizado según las instrucciones del fabricante (Pronadisa). Este medio se emplea, fundamentalmente, para diferenciar a las bacterias de la familia Enterobacteriaceae, como una de las clásicas pruebas IMViV y

otras. En él solo crecen aquellas bacterias que puedan utilizar el citrato como única fuente de carbono. Tras la siembra, la incubación debe mantenerse durante cuatro, cinco ó más días, pues algunas de las cepas estudiadas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* sólo asimilan el citrato tardamente. Al igual que ocurre con las *Enterobacteriaceae*, la aparición de un crecimiento visible va acompañada de una alcalinización, viraje a color azul, del indicador de pH azul de bromotinol.

Medio GI para movilidad

Empleamos Bacto-Motility GI Medium de Difco o medio para movilidad con infusión de gelatina, con la siguiente composición:

Caldo de infusión de corazón	25 g.
Gelatina	53.4 g.
Agar	3 g.
Agua	1000 ml.

Es un medio semisólido para demostrar la movilidad de las bacterias.

El medio se distribuye en tubos, a 5 ml. se esteriliza, y se siembra en picadura limpia hasta la profundidad. Tras la incubación, las bacterias inmóviles sólo crecerán en el lugar de la picadura, mientras que las bacterias móviles se extenderán a partir de ella hacia las paredes del tubo.

Agua Triptonada

Medio líquido con la siguiente composición:

Tryptona _____	10 g.
Na Cl _____	5 g.
Agua _____	1000 ml.

Como la Tryptona es una peptona especialmente rica en triptófano, este medio es el más adecuado para detectar la producción de indol.

El medio se distribuye en tubos, a 5 ml. cada uno, y se esteriliza. Tras la siembra e incubación, se añade a cada tubo 0.5 ml. de xileno, se agita enérgicamente y se deja reposar, de forma que se extraiga el indol en la fase superior. A continuación se añaden unas gotas del Reactivo de Ehrlich-Kovacs. La producción de indol se manifiesta por la aparición de una coloración rojo cereza en la parte superior del tubo, mientras que si no hay cambio en el color del reactivo, la prueba es negativa.

El reactivo de Ehrlich-Kovacs está compuesto por:

p-dimetilaminobenzaldehído _____	5 g.
Alcohol amílico _____	75 ml.
H Cl _____	25 ml.

Caldo de Urea

Empleamos Bacto-Urea Broth de Difco, que se basa en la fórmula de Stuart, Van Stratum y Rustigian, para la detección de ureasa. Al estar compuesto por un tampón fosfato fuerte, ha sido empleado para diferenciar los *Proteus* de otras *Enterobacteriaceae*, debido a su capacidad para producir suficiente amoníaco para que de una reacción de una alcalinidad superior a un pH de 8.1.

Una vez preparado el medio, debe ser esterilizado por filtración, por ser la urea termolabil, y distribuido en tubos estériles en condiciones asépticas.

Tras la siembra e incubación, la hidrólisis de la urea se manifiesta por un cambio de color de amarillo (pH 6.8) a rojo púrpura (pH 8.1 ó más).

Agar Fenilalanina

Empleamos Phenylalanine Agar de Oxoid, un medio para detectar la desaminación oxidativa de fenilalanina a ácido fenilpirúvico. Este medio, junto con el anterior, se emplea para la diferenciación de *Proteus* de otras *Enterobacteriaceae*.

El medio, una vez esterilizado, se deja solidificar en posición inclinada, se siembra masivamente en superficie y, tras la incubación, se añade una solución de cloruro férrico al 10% sobre el cultivo. La reacción positiva se manifiesta por la aparición de un color verde oscuro, mientras que en la reacción negativa el reactivo mantiene su color amarillo.

Caldo de Lisina Descarboxilasa

Empleamos el medio deshidratado Bacto Lysine Decarboxylase Broth de Difco. También es un medio empleado habitualmente en la identificación de *Enterobacteriaceae*. Dichas bacterias, en las primeras horas de incubación producen ácido a partir de la glucosa, con la que vira el indicador, púrpura de bromocresol, a amarillo. Aquellas bacterias que producen descarboxilación de la lisina a cadaverina, alcalinizan el medio, pasando de amarillo a púrpura oscuro.

Medio MR-VP

Este es un medio líquido clásico que se emplea en las pruebas IMViC para Enterobacteriaceae. Denominado antiguamente Medio de Clark y Lubs, en honor a los primeros que utilizaron la prueba del Rojo de Metilo, hoy día la mayoría de las casas comerciales lo denominan MR-VP. Nosotros hemos empleado el medio deshidratado de Pronadisa.

Las dos pruebas que nos permite realizar este medio de cultivo (MR o Rojo de Metilo, y VP o Voges-Proskauer) se basan en la fermentación que producen las Enterobacteriaceae a partir de la glucosa. En dicha fermentación se liberan una serie de compuestos parcialmente oxidados, como el ácido acético, ácido fórmico, ácido málico, ácido láctico, etanol, glicerina, acetoina y 2,3-butanodiol; gases, como dióxido de carbono e hidrógeno molecular. Los distintos géneros y especies de la familia dan diferentes mezclas de productos finales. Mientras que en el llamado tipo *Escherichia coli* se forman predominantemente ácidos y no se forma butanodiol, en el tipo *Enterobacter*, la cantidad de ácidos es inferior a la del producto principal, el butanodiol. El primer tipo da, por tanto, positiva la prueba MR, mientras que el segundo tipo da positiva la prueba VP, que detecta la acetoina, producto anterior al 2,3-butanodiol en esta fermentación. (Schlegel. 1975).

Tras la incubación de la bacteria en 5 ml. del medio, se separa el cultivo en dos tubos con la mitad cada uno. En uno de ellos se realiza la prueba del Rojo de Metilo (producción de ácidos) añadiendo las gotas de una solución de rojo de metilo al

0.5% en etanol de 60 : la reacción positiva se detecta por el color rojo del indicador ($\text{pH} < 4.5$), mientras que la reacción negativa se manifiesta por el color amarillo del indicador ($\text{pH} > 4.5$). En el tubo restante se realiza la otra prueba, añadiendo 1 ml. del reactivo de Voges-Proskauer 1 (α -naftol al 6% en etanol de 60) y 2 ml. de reactivo de Voges-Proskauer 2 (KOH al 16% en agua), se agita enérgicamente y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente: la producción de acetoina (Voges-Proskauer positivo) se manifiesta por la aparición de un color rosa a rojo, limitado a la superficie o generalizado (Buttiaux et al. 1974).

Medio para probar la inhibición por KCN
(Buttiaux et al. 1974)

La inhibición por cianuro potásico es una de las pruebas de identificación para Enterobacteriaceae que figuran en los dos últimos Bergey's.

La técnica de Buttiaux emplea el siguiente medio de cultivo:

Peptona	_____	10 g.	
Na Cl	_____	5 g.	
Na ₂ PO ₄ H	_____	5.63 g.	
K P O ₄ H ₂	_____	0.22 g.	
Agar	_____	1 g.	
Agua	_____	1000 ml.	pH=7.5

El medio se reparte a 2 ml. por tubo. En el momento del uso se añade a cada tubo 0.1 ml de una solución de KCN al 0.5% en agua (esterilizada por filtración y conservada en

nevera). Se agita suavemente. Se inocula con tres asadas de un cultivo de 18-24 horas en agua peptonada, se emulsionan las bacterias en todo el medio de cultivo. Tras la incubación, la aparición de un disco blanco neto en la superficie del tubo, indica el desarrollo de la bacteria y, por tanto, prueba positiva.

Agar Base con Rojo Fenol

Empleamos Bacto-Phenol Red Agar Base de Difco, un medio para identificación de bacterias, según la fermentación, con producción de ácidos y/o gases, de diferentes fuentes de carbono. El medio está originalmente exento de fuente de carbono, permitiéndonos variar dicha fuente añadiéndola hasta concentración de un 1%, o bien introduciendo en los tubos diferentes Gluci-Discs de Biomerieux o Bacto Differentiation Disks Carbohydrates de Difco. En concreto hemos empleado las siguientes fuentes de carbono: adonitol, arabinosa, dulcitol, fructosa, galactosa, glucosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, salicina, sorbitol, trehalosa y xilosa.

Al medio sólido esterilizado y fundido se le añade en condiciones de esterilidad el disco con la fuente de carbono o la solución de dicha fuente esterilizada por filtración, se deja solidificar en posición inclinada. Se siembra por picadura en superficie y, tras la incubación, la producción de ácidos se detecta porque el indicador de pH, rojo fenol, vira a color amarillo, mientras que la producción de gases se manifiesta por la aparición de burbujas o grietas en el agar.

Las bacterias que no fermentan la correspondiente fuente de carbono pueden crecer en el medio, al ser un medio rico, pero no hacen virar el indicador, o bien lo alcalinizan a rojo púrpura al asimilar la peptona y liberar amoníaco.

Agar Sacarosa

Es Agar Nutritivo al que se añade un 5% de sacarosa. Se emplea para determinar la producción de levano (Lelliot et al. 1966), ya que estos autores utilizaron esta prueba como forma de diferenciar entre *Pseudomonas* saprófitas y fitopatógenas, aunque posteriormente (Misaghi et al. 1969) se vió que muchas cepas de *Pseudomonas fluorescens* daban positiva también esta reacción. Dicha reeacción positiva se manifiesta por un crecimiento en la superficie del medio sólido dando colonias mucosas, abombadas y brillantes.

Enterotube Roche

Este es uno de los muchos métodos rápidos de identificación de bacterias que han ido proliferando en los últimos años, sobre todo en el caso de las *Enterobacteriaceae*, para evitar la tradicional batería de pruebas bioquímicas. Este método consiste en un tubo con ocho compartimentos que pueden ser inoculados simultáneamente con una colonia dándonos, finalmente once resultados de pruebas bioquímicas. El clásico diagrama de lectura ha sido procesado por ordenador usando el código binario, del que surge el "Computer coding and identification system for Enterotube Roche", unas tablas para la determinación sin necesidad de usar ordenador. El sistema

utiliza números binarios para representar las respuestas positivas o negativas a una secuencia ordenada de preguntas en relación con las once reacciones bioquímicas. El número 1 indica una reacción positiva y el 0 una reacción negativa, de forma que se obtiene un valor binario de once dígitos para cada bacteria.

Las pruebas que nos proporciona el Enterotube son: fermentación de glucosa, producción de gas con glucosa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, producción de sulfhídrico, producción de indol, fermentación de lactosa, fermentación de dulcitol, desaminación oxidativa de fenilalanina, hidrólisis de la urea y utilización de citrato.

Cada dos ó tres de estas pruebas son agrupadas, asignando un valor numérico a cada una de ellas cuando son positivas, siendo este valor cero cuando son negativas. Por ejemplo, se agrupan la fermentación de glucosa (con valor 2) y la producción de gas con glucosa (con valor 1), así, una bacteria que sea glucosa positiva y gas negativa será $2 + 0 = 2$. La siguiente agrupación es con lisina (4), ornitina (2) y sulfhídrico (1), dándonos unos valores entre cero y siete. A continuación se agrupan indol (4), lactosa (2) y dulcitol (1), que nos darán también dichos valores. Finalmente se leen los valores de fenilalanina (4), urea (2) y citrato (1). Con todos estos datos se obtiene el llamado valor ID, un número de cuatro cifras que, junto con el valor binario es el que nos identifica en las tablas el género y/o la especie de bacteria.

Las limitaciones del método Enterotube son parecidas a las que tienen otros métodos similares, principalmente el

hecho de que se trata de un sistema pensado para la identificación de bacterias de importancia clínica, y no se consideran otros microorganismos, como los fitopatógenos.

En cuanto al uso práctico del método, nos remitimos a las instrucciones del fabricante.

Oxi-Ferm Tube Roche

Este método, desarrollado por la misma empresa, y basado en los mismos principios, se emplea para la identificación de bacterias Gram-negativas con metabolismo oxidativo o con metabolismo fermentativo, siempre que no sean Enterobacteriaceae. En este caso, el tubo consta de ocho compartimentos que nos proporcionan nueve pruebas bioquímicas, añadiéndose a estas la prueba de la oxidasa que se realiza externamente.

Las pruebas del Oxi-Ferm Tube son: fermentación de glucosa, presencia de arginina dihidrolasa, producción de N molecular, producción de sulfhídrico, producción de indol, utilización de xilosa, oxidación de glucosa, hidrólisis de la urea y utilización de citrato.

La agrupación de pruebas para la obtención del valor ID, también de cuatro cifras, es como sigue: El primer dígito se obtiene con las pruebas de fermentación de glucosa (4), arginina dihidrolasa (2) y producción de N (1). El segundo, con sulfhídrico (4), indol (2) y xilosa (1). El tercero con oxidación de glucosa (4), urea (2) y citrato (1). Y el cuarto número lo proporciona sólo la prueba de la oxidasa, 1 cuando es positiva ó cero cuando es negativa.

API 20 E

El API 20 E es un sistema para identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos mediante veintitrés pruebas bioquímicas normalizadas y miniaturizadas y una base de datos. Consta de veinte microtubos que contienen los substratos deshidratados que se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontáneos, o bien los inducimos al añadir reactivos.

Las veintitrés pruebas bioquímicas son:

--ONPG u orto-nitrofenil- β -D-galactósido, una prueba para detectar la β -galactosidasa. Dicha enzima es capaz de actuar sobre el substrato, liberando orto-nitrofenol, de color amarillo.

--Arginina dihidrolasa, ya descrita anteriormente.

--Descarboxilación de aminoácidos: lisina y ornitina.

--Utilización de citrato.

--Producción de sulfhídrico.

--Hidrólisis de la urea.

--Tryptófano desaminasa: tras la incubación se añade un reactivo a base de Fe_3Cl al 3.4% en agua. Un color marrón oscuro indica reacción positiva.

--Producción de indol: tras la incubación se añade el reactivo de Ehrlich-Kovacs, que ya ha sido descrito. La reacción positiva se manifiesta por la aparición de un anillo rojo cereza.

--Voges-Proskauer: Para detectar la producción de acetoina,

como en el medio MR-VP, se añade el reactivo Voges-Proskauer 1 y Voges-Proskaver 2, apareciendo una coloración de rosa a rojo en diez minutos.

--Hidrólisis de la gelatina: se basa en la técnica de Kohn (Buttiaux et al. 1974). En caso de que la bacteria hidrolice la gelatina, se produce la difusión de la tinta china que contiene el medio, en lugar del carbón vegetal que empleaba el medio original.

--Pruebas de fermentación u oxidación de fuentes de carbono: son medios de cultivo que contienen, además de la fuente de carbono, azul de bromotínol, como el Medio O-F, por lo que se puede detectar la fermentación por la aparición del color amarillo en el fondo que se extiende hacia la superficie, o la oxidación, por la aparición de la coloración amarilla en la superficie. Las bacterias que no oxidan ni fermentan la fuente de carbono dejan el medio de color verde o azul por alcalinización. Las fuentes de carbono que contiene el sistema son glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa.

--Prueba de la oxidasa: se realiza externamente al sistema.

--Reducción de nitratos a nitritos: se realiza en el tubo de la glucosa, una vez anotado el resultado, con los mismos reactivos ya descritos en el Caldo de Nitrato.

--Reducción de nitritos a N molecular: Cuando la reacción de los nitritos da negativa, puede ser porque la bacteria no sea capaz de reducir los nitratos a nitritos, o bien porque continúe la reducción de estos hasta N molecular, no quedando

nitritos en el medio. La detección de N se realiza añadiendo una pequeña cantidad de polvo de Zn, manifestándose la reacción positiva por un color amarillo acompañado de burbujeo, mientras que si adquiere color rosa o rojo es negativa.

Además de estas veintitrés pruebas, a veces se consideran cuatro más, realizadas externamente, en aquellos casos en los que no hay suficiente discriminación. Estas cuatro adicionales son: crecimiento en Agar Mac Conkey, Movilidad, oxidación de glucosa en medio O-F y fermentación de glucosa en medio O-F.

De forma similar al Enterotube, del conjunto de reacciones debe obtenerse un perfil numérico. En una hoja de resultados las pruebas están en grupos de tres y cada uno tiene asignado el valor 1, 2 ó 4. Así se puede obtener un perfil de 7 cifras y, si este no discrimina bastante, con las pruebas complementarias, otro de 9 cifras.

Con estos perfiles se consultan las tablas, denominadas "Analytical Profile Index API 20 E", que nos dan la identificación. En las tablas nos aparecerá la especie identificada, el porcentaje de identificación, las pruebas en contra (si las hay) con el porcentaje de reacciones positivas que se observa normalmente en esta especie y un comentario sobre la calidad de la identificación. En los casos de poca discriminación entre dos o tres taxones, aparece una nota que nos lleva a una tabla donde se indican las pruebas que pueden diferenciarlos.

En cuanto al uso práctico del sistema, hemos seguido

las instrucciones del fabricante.

API 20 NE

Es un sistema que combina ocho pruebas convencionales y doce pruebas de asimilación para la identificación de bacilos Gram-negativos no Enterobacteriaceae.

La galería API 20 NE consiste en veinte microtubos que contienen medios y/o substratos deshidratados.

Las pruebas convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana en solución fisiológica que rehidrata los medios. Las reacciones producidas durante la incubación se traducen en cambios de color debido a los indicadores que llevan o bien revelados al añadir reactivos posteriormente.

Las pruebas de asimilación se inoculan con un medio mínimo (API Aux Medium), y las bacterias sólo crecen si son capaces de asimilar el substrato correspondiente.

Las pruebas convencionales son:

--Reducción de nitratos y/o reducción de nitritos a N molecular, ya descrita anteriormente.

--Producción de indol.

--Fermentación de glucosa.

--Arginina dihidrolasa.

--Hidrólisis de la urea.

--Hidrólisis de la esculina: Esta prueba nos detecta la existencia de una β -glucosidasa, ya que la esculina es 6, β -glucósido -7- hidroxycumarina y al actuar sobre ella la enzima se produce β -D-Glucosa y 6,7-dihidroxycumarina. Este último compuesto, al reaccionar con iones férricos (contenidos en el

medio en forma de citrato férrico) forma un complejo de color castaño oscuro o negro (Mac Faddin. 1980).

--Hidrólisis de la gelatina.

--PNPG ó para-nitrofenil β -D-galactopiranosido: Una prueba para detectar la β -galactosidasa que funciona igual que la ONPG, con la diferencia que en lugar de liberarse orto-nitrofenol se libera para-nitrofenol, también amarillo.

Las pruebas de asimilación se manifiestan por turbidez, cuando son positivas, y por la transparencia, cuando son negativas. Los substratos que contienen estas doce pruebas son: glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato y fenil-acetato.

Como prueba adicional se realiza externamente la de la oxidasa.

Al igual que en el API 20 E, las veintiuna pruebas son reunidas de tres en tres, asignando un número de 1, 2 ó 4 para cada una, obteniéndose un perfil de siete cifras. Con este número de siete cifras se consulta el "Analytical Profile Index API 20 NE", obteniéndose una información similar a la del sistema API 20E.

1.6.5. Medios de cultivo para el recuento de microorganismos.

Agar para Métodos Estándar

Es un medio de cultivo rico en nutrientes y elaborado de acuerdo a la formulación de la APHA, que se emplea en el recuento total de microorganismos de leche,

alimentos, orinas o cualquier otro habitat. Nosotros hemos utilizado el medio deshidratado de Pronadisa, siguiendo sus instrucciones de preparación.

1.6.6. Medios de cultivo para la producción de AIA y/o Siringomicina.

Medio de Glucosa y Peptona.

Este medio, llamado Medio B por Comai y Kosuge (1980), es un medio líquido con la siguiente composición:

Proteose Peptone _____	10 g.
D-Glucosa _____	15 g.
K ₂ H PO ₄ . 3H ₂ O _____	2 g.
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O _____	0.4 g.
Agua _____	1000 ml. pH= 7.0

Comai y Kosuge han empleado este medio de cultivo como ideal para detectar la producción de ácido indolacético.

Medio de Glucosa y Triptona

Este medio de cultivo es un derivado del anterior en el que hemos sustituido la Proteose Peptone de Difco por Bacto-Tryptone de la misma marca, basándonos en las diferencias de composición que nos da el propio fabricante. La Triptona es la peptona que tiene mayor contenido en triptófano, por lo que la hemos introducido para favorecer la producción de AIA.

Caldo de Patata y Glucosa

Es un medio de cultivo que ha sido empleado por Gross et al. (1977) para la producción de Siringomicina. Estos

autores utilizaron Bacto-Potato Dextrose Broth de Difco, suplementado con un 0.4% de Hidrolizado de caseína. Nosotros hemos empleado este mismo medio de cultivo de Difco, con el mismo suplemento, así como un medio preparado a partir de patatas con la misma formulación:

Patatas, infusión de _____	200 g.
D-Glucosa _____	20 g.
Hidrolizado de caseína _____	4 g.
Agua _____	1000 ml.

Las patatas se pelan y se cortan en pequeños trozos, se pesan y se ponen en agua hirviendo durante unos 20 minutos. A continuación se decanta el caldo obtenido, se reajusta la concentración con agua y se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos para que no quede ningún residuo sólido en suspensión. Finalmente se añade la D-glucosa, el hidrolizado de caseína y se esteriliza en autoclave.

Caldo Nutritivo

Hemos empleado el medio deshidratado de Pronadisa, elaborado de acuerdo a la fórmula de la APHA y en el que crecen una gran variedad de microorganismos que no son muy exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas. Este medio de cultivo lo utilizamos para contrastar los resultados de la producción de AIA y/o Siringomicina.

2. METODOS

2.1. Aislamiento de bacterias de la flora asociada a los tumores.

Para el aislamiento de bacterias a partir de los tumores de las diferentes plantas afectadas por la tuberculosis (olivo, acebuche, adelfa, fresno y retama), es necesario seleccionar tumores jóvenes, que se diferencian claramente por su color gris-verdoso y porque el tejido circundante no aparece endurecido y necrótico. Una vez seleccionado un tumor de estas características se le somete a un lavado en una solución detergente y germicida para eliminar la segura contaminación externa. En nuestro caso hemos utilizado una solución de cloruro de benzalconio al 1:1000, sumergiendo los tumores en dicha solución y manteniéndolos en agitación con agitador magnético durante 15 minutos. Este tratamiento tiene la ventaja de que al ser un detergente catiónico ayuda a desprender los microorganismos de la superficie a diferencia de las soluciones puramente germicidas, como el cloruro mercurico, empleadas por la mayoría de los autores. Los tumores así tratados se lavan repetidas veces con agua destilada estéril y se transfieren a un mortero esterilizado y flameado antes del uso, añadiendo solución fisiológica estéril, siendo machacados en condiciones asépticas bajo la llama de mechero. Finalmente se siembra por agotamiento a partir del mortero con asa de siembra en los medios adecuados para el crecimiento de las bacterias ya descritas en el apartado 1.6.1. de este capítulo.

Otra técnica más simple que hemos ensayado con éxito

en los muestreos realizados en el campo ha sido cortar cada tumor con una cuchilla esterilizada con etanol y flameada, de forma que quedan al descubierto las zonas del tumor que contienen las bacterias. A partir de ahí y con asa de siembra o con hisopo estéril se pasa a los medios de cultivo estériles.

Finalmente, también hemos podido aislar las bacterias directamente desde el exterior en los momentos en que éstas llegan a rezumar, durante las primeras lluvias de la primavera y del otoño. La siembra se realiza con asa, desde la colonia que surge del tumor, en medio sólido.

2.2. Producción de anticuerpos para la identificación rápida de bacterias.

Para poder efectuar los estudios ecológicos de la distribución y variabilidad de la flora asociada a los tumores, se vió la necesidad de tener un método de identificación rápido, puesto que el gasto de tiempo haría inviable el tratar de identificar por los métodos clásicos todas las bacterias contenidas en los cientos de muestras tomadas. Por otro lado existiría una limitación en el costo económico de tal cantidad de medios de cultivo. Debido a dichas razones, nos planteamos el tener una colección de sueros específicos para las bacterias que aparecían en los tumores.

La siembra de las bacterias se realiza en masa sobre la superficie de placas de Agar Nutritivo endurecido, un agar que preparamos con un 1.8% de agar-agar en lugar del 1.5% que lleva normalmente. Esta consistencia del medio de cultivo es necesaria para poder recolectar con el asa las bacterias sin que

se desprenda el agar. La incubación se realiza durante 72 horas a 25° C para que haya abundante crecimiento.

Tras la incubación, se vierten sobre cada placa 10 ml. de solución fisiológica tamponada estéril a pH 7.2 (Na Cl 7.650 g/l, $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0.724 g/l. y $\text{K PO}_4\text{H}_2$ 0.210 g/l), llamada también tampón PBS. Las bacterias son suspendidas en el líquido empleando el asa de siembra estéril y limpia, y recogidas en tubo de centrifuga. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado (las bacterias) en nuevo tampón PBS. Este proceso de lavado se repite 3 ó 4 veces para eliminar completamente los restos de medio de cultivo y queden las bacterias completamente limpias.

Finalmente se prepara una suspensión de bacterias que tenga un tono blanco opalescente (el número de microorganismos será de $1-1.5 \times 10^6$ por ml), aunque en este caso no se necesita una gran exactitud.

La fijación de las bacterias se realiza añadiendo a cada tubo una solución de glutaraldehído al 25% en cantidad que dé una concentración total de glutaraldehído de un 2.5 %. En esta solución se mantendrán las bacterias a 4°C, en la nevera, durante 4 horas.

Posteriormente se hacen tres lavados en PBS, centrifugando y eliminando el sobrenadante cada vez, al objeto de que no quede glutaraldehído en el medio. Las bacterias así fijadas se pueden mantener en el congelador de la nevera, suspendidas en PBS, hasta su uso para cada inyección del

antígeno.

La inyección de la suspensión antigénica se hace con 1 ml. de la preparación de bacterias lavadas mezcladas con 1 ml. de Adyuvante de Freund Incompleto (Difco). La mezcla debe hacerse agitando enérgicamente en un agitatuvo, porque el adyuvante es altamente insoluble.

Se inyectan 2 ml. de esta mezcla por vía intramuscular en las patas traseras de conejos neocelandeses de California. La inyección se repite cada semana durante uno ó dos meses al objeto de que el animal quede hiperinmunizado, es decir, con una elevada concentración de anticuerpos en suero.

Para hacer la extracción de sangre de los animales previamente se frota la oreja con un algodón impregnado en xileno, para que los vasos se hinchen. Una vez que se consigue este objetivo, la sangre se extrae con jeringa a partir de la arteria central que discurre por la oreja del conejo, tirando suavemente del émbolo. La jeringa debe estar previamente heparinizada (500 unidades de heparina por ml. de solución fisiológica).

La sangre obtenida se centrifuga en tubos heparinizados a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos, separándose así el suero de las células.

2.2.1. Purificación de las IgG. (Sánchez Botija, C. y Ordas, A. Comunicación personal.)

El suero se precipita con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, añadiendo el sulfato gota a gota a un volumen igual de suero, en agitación constante a 4°C en tubo de centrifuga.

Dichos tubos se introducen en un recipiente con hielo picado para conseguir, aproximadamente, los 4°C durante la agitación con una varilla de vidrio. Una vez precipitadas las proteínas se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en un pequeño volumen de agua destilada.

El sedimento resuspendido en agua destilada se pone en una bolsa de diálisis y se dializa frente a tampón fosfato 0.175 M a pH 6.3 durante 24 horas ó más, a 4°C en agitación continua, renovando ocasionalmente el tampón.

El suero dializado se cromatografía a través de una columna de DEAE celulosa (Whatman DE-32), preciclada con HCl 0.5N y NaOH 0.5, desgasificada, según las instrucciones del fabricante, y equilibrada con tampón fosfato 0.175 M a pH 6.3. A este pH eluyen las IgG. El análisis de las fracciones se realiza por su actividad biológica, enfrentando una gota de cada una con otra de una suspensión bacteriana (fijada o viva) del microorganismo correspondiente en un porta. La reacción de aglutinación, que se produce de forma casi instantánea, es visible a nivel macroscópico. (Figura 22.)

2.2.2. Comprobación de la pureza de las IgG por electroforesis.

A partir de los tubos positivos, la comprobación de que se tienen las IgG puras se realiza por electroforesis en cubeta Sepratek Chamber (Gelman Instrument Company), poniendo en uno de los puntos de aplicación el suero de conejo hiperinmunizado para comparar, y en otro paralelo las IgG. Se

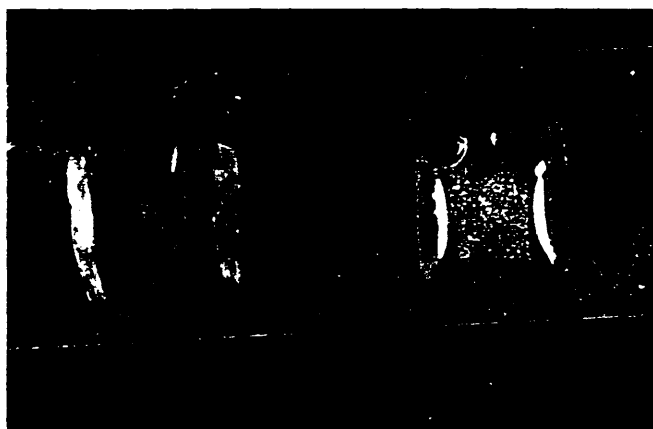


Figura 22. Reacción de aglutinación de una suspensión de *P. syringae* pv. *savastanoi* (derecha). A la izquierda, un control negativo.

realizan cuatro aplicaciones por muestra con un aplicador Sepratek Applicator, en Super Sepraphore.

La electroforesis se efectúa en tampón Tris-Barbital-Barbital sódico pH 8.8 (32.1% Trimetamina (Tris), 13.7% Barbital y 54.2% Barbital Sódico), a intensidad constante de 5 mA, suministrada por una fuente G-200 de Groc Instruments durante 45 minutos.

El revelado de las bandas se realiza con negro amido al 0.5% en metanol -a. acético 9:1 (v/v) durante 5 minutos. La decoloración se hace con metanol -a. acético 54:6, repitiéndola tres veces, y el aclarado con metanol - a. acético 34:6, una vez. (Figura 23).

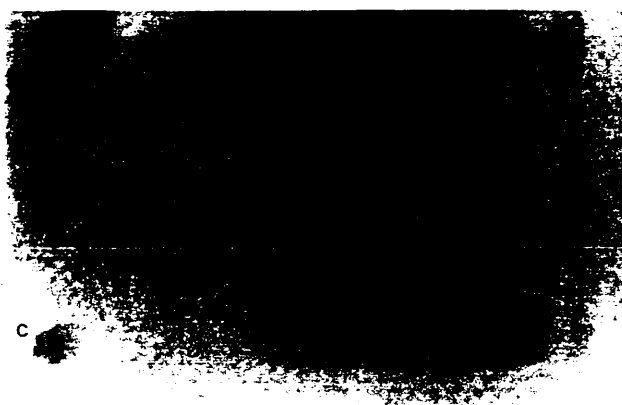


Figura 23. Electroforesis para comprobar la pureza de las IgG. A, suero completo concentrado. B, suero tras la precipitación con sulfato amónico y la diálisis. C, IgG obtenida por cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

2.2.3. Almacenamiento de las IgG.

Una vez comprobada la pureza de las IgG, estas pueden ser almacenadas de tres formas:

- ..Una parte puede ser liofilizada para su uso a largo plazo.
- ..Una segunda parte puede ser congelada a -30°C para su uso a medio plazo.
- ..Finalmente, la parte que se tenga para su uso inmediato puede guardarse en pequeñas fracciones en el congelador de la nevera. A esta última parte es conveniente añadirle

una pequeña cantidad de azida sódica para evitar la contaminación normal que se produzca con su uso.

2.2.4. Marcaje de Anticuerpos con Fluoresceína.

Para poder emplear los anticuerpos obtenidos en el apartado anterior en microscopía de fluorescencia, marcamos los IgG con isotiocianato de fluoresceína isómero I (FITC) (Sigma).

En primer lugar hay que valorar la concentración de proteína, empleando el método de Lowry et al. (1951), de forma que podamos calcular la cantidad de FITC a añadir a las IgG. Según Griffin et al. (1961), el conjugado óptimo se obtiene utilizando de 0.025 a 0.0125 mg. de FITC por mg. de proteína.

El conjugado del FITC con las IgG se realiza añadiendo 0.020 mg. de FITC a una solución de las IgG a pH 8.8 (en tampón carbonato-bicarbonato 0.5 M) en frío (4°C) durante un mínimo de 4 horas y no más de 18 (en nuestro caso lo dejábamos toda la noche en agitación en la cámara fría).

Para eliminar el exceso de FITC, se dializa frente a tampón PBS pH 7.2, en agitación continua en la cámara fría, cambiando frecuentemente el tampón, hasta que este deje de presentar fluorescencia, lo que se puede comprobar con una lámpara ultravioleta en la oscuridad dentro de la misma cámara.

La purificación final del conjugado se realiza a través de una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) (Killander et al 1961, modificado).

La comprobación de la efectividad del conjugado se hace realizando una tinción de la bacteria específica de la siguiente manera:

- Se hacen frotis con la bacteria en los compartimentos de un porta FA Test Slide (Biomerieux).

- Se fija por calor a la llama de un mechero Bunsen.

- Se cubre cada compartimento con el conjugado, incubando durante 30 minutos a 37°C.

- Se lava varias veces con tampón PBS pH 7.2 (PBS buffer, Biomerieux).

- Se cubre con glicerina tamponada (Buffered glycerine, Biomerieux), se pone un cubre y se añade más glicerina tamponada como medio de inmersión.

Las preparaciones se observan con microscopio de fluorescencia empleando un objetivo de inmersión en glicerina 100 X.

2.3. Análisis cuantitativo de la flora epifítica del olivo.

La toma de muestras se realizó a lo largo de cuatro años en meses alternos en los olivares de la Raña de la Mascara, comarca de Navahermosa. Los olivos elegidos fueron:

- Olivos de la variedad Cornicabra con ataques normales de tuberculosis. (1985, 1986, 1987 y 1988).

El último año (1988) tomamos, para contrastar resultados, muestras de:

- Olivos de la variedad Manzanilla, practicamente sin tuberculosis.

- Olivos jóvenes, sin tuberculosis detectable, de la variedad Cornicabra.

A partir de varios olivos de cada uno de los tipos definidos se tomaban las siguientes muestras:

- 50 hojas con diferente tamaño y, por tanto, en varios grados de diferenciación, tomadas de distintos lugares de cada planta, procediendo las plantas de puntos alejados entre si cientos de metros.

- 50 trozos de ramitas de 5-10 cms. de longitud, tomadas en las mismas condiciones que las hojas.

Cada una de las muestras era introducida en un tubo con 10 ml. de solución fisiológica tamponada (tampón PBS pH 7.2) y sometida a agitación durante 120 minutos.

A partir de cada muestra se preparan dos diluciones decimales en condiciones de esterilidad en tubos con 9 ml. de tampón PBS estéril añadiendo 1 ml. de tubo de la muestra al siguiente, homogeneizado bien, y pasando 1 ml. al último. De cada uno de estos tres tubos se siembra con pipeta estéril, en condiciones asépticas en placas Petri vacías y estériles, poniendo en cada una 1 ml. Con ello habremos puesto en las placas las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de la muestra original.

Sobre cada una de las placas se añaden 15 ml. de Agar para Métodos Estándar fundido, que se habrá mantenido, tras su esterilización, en baño a una temperatura de 42-45°C. El agar se mezcla bien con las bacterias por rotación de las placas, se deja solidificar y se incuba a 25°C durante 4 días.

Una vez hecha la siembra, cada muestra (hoja o rama) es extraída del tubo para efectuar el cálculo del área. en las hojas, dicho cálculo se realiza dibujando el contorno sobre papel milimetrado, calculando los cm^2 . de la superficie y multiplicando por dos. En las ramas, calculando la longitud de

la circunferencia y multiplicando por la longitud de la rama.

Tras la incubación de las placas, se cuenta el número total de microorganismos, en las tres diluciones. En este tipo de recuentos, se suelen considerar como representativos los números comprendidos entre 30 y 300, ya que los números inferiores a 30 no son representativos desde el punto de vista estadístico, y los superiores a 300 por ser incontables a simple vista. En nuestro caso hemos considerado todos los superiores a 300, ya que los podíamos contar con ayuda del contador Gallenkamp Colony Counter. También hemos considerado los números inferiores a 30, siempre que estos aparecieran en la dilución 10^{-1} , porque, en caso contrario, nos quedarían muestras sin medir.

Así, en una muestra en la que contásemos 3.225, 330 y 35 u.f.c. en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} respectivamente, calculando la media de microorganismos en las tres diluciones, nos daría 33.416. Si la muestra fuera una hoja de 10 cm^2 de superficie, obtendríamos un número total de 3.341 microorganismos/ cm^2 .

Si en la muestra contásemos, por ejemplo, 26 u.f.c. en la dilución 10^{-1} , consideraríamos 260 microorganismos para referirlo a la superficie como en el caso anterior, independientemente de que el número de colonias fuera inferior a treinta.

2.4. Recuento de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* en la flora epifítica del olivo.

Hemos empleado las mismas diluciones del apartado

anterior pero, en lugar de sembrarlas en Agar para Métodos Estándar, sembrando en Medio B de King con Antibióticos. En este medio de cultivo, conociendo el aspecto del crecimiento de *P. syringae*, podíamos hacer el recuento, pero es posible el crecimiento de otras *Pseudomonas* fitopatógenas que fueran resistentes también a los β -lactámidos. Para mayor seguridad de que las colonias que contábamos eran *P. syringae*, a partir de cada placa hacíamos reacción de aglutinación con 2 ó 3 colonias empleando los anticuerpos específicos obtenidos según describimos en el apartado 2.2.1.

2.5. Análisis cualitativo de la flora epifítica y de la flora asociada a los tumores.

La toma de muestras de olivo se realizó en la Raña de la Mascara, en olivares de la localidad madrileña de Villaviciosa de Odón, en Méntrida (Toledo) y en una serie de olivos transplantados hace 12 años al recinto del Colegio San Pablo C.E.U., en la Urbanización Montepríncipe, Boadilla del Monte (Madrid). Se tomaron muestras de tumores, hojas, ramas y suelo.

Las muestras de adelfa procedían de la calle de Arturo Soria (Madrid), de la calle Villaviciosa en la zona de Campamento (Madrid) y del recinto del Colegio San Pablo C.E.U.

Las muestras de retama se tomaron en los alrededores del Río Cedena, en la carretera de Boadilla del Monte, entre los kilómetros 6 y 7 y en el recinto del Colegio San Pablo C.E.U.

Finalmente, las muestras de fresno procedían todas de

la ribera del Río Cedula.

Todas estas muestras fueron sembradas, empleando hisopos estériles in situ, en los distintos medios de cultivo generales, diferenciales y selectivos descritos en el apartado 1.4.1., es decir: Agar Nutritivo, Agar Nutritivo con 1.5. g/l. de Sales Biliares, Agar Nutritivo con 2.5. mg/l. de Cristal Violeta, Medio B de King, Medio D4, Medio D3 y Medio D1.

En este caso no empleamos ningún medio con antibióticos, ya que se trataba de hacer un estudio de la variabilidad de las bacterias y el patrón de resistencia-sensibilidad podía ser una de las características sometidas a variación.

2.5.1. Reacciones de aglutinación.

Para hacer reacciones de aglutinación empleamos sueros obtenidos frente a dos cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi*, las denominadas Ps 1 (de olivo) y Ps A (de adelfa), sueros frente a dos cepas presentes en la flora tumoral de olivo, no determinadas o mal determinadas en la bibliografía, como veremos más adelante, en concreto una cepa de pigmentación amarilla (a la que denominaremos Ea) y una cepa apigmentada (a la que llamaremos Eb). También utilizamos sueros frente a *Agrobacterium tumefaciens* V, *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (C.E.C.T. 314, N.C.P.P.B. 549) y *Erwinia carotovora* var. *carotovora* (C.E.C.T. 225, N.C.P.P.B. 312), para intentar la reacción de aglutinación con la flora tumoral no *Pseudomonas*.

Las reacciones de aglutinación se efectúan como se indicó en el apartado 2.2.1.

2.5.2 Pruebas bioquímicas.

Todas las bacterias clasificadas como presuntas *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, procedentes de los medios de cultivo empleados en 2.5 y que aglutinaban con los sueros Anti-Ps1 y Anti-PsA, eran sometidos a las pruebas de la catalasa (que tendría que ser positiva) la oxidasa (negativa), la Arginina dihidrolasa (negativa) y el Medio OF de Hugh y Leifson (oxidación). Una vez confirmadas estas cuatro pruebas se realizaban todas las pruebas de identificación para *Pseudomonas*, incluyendo el Oxi Ferm tube y el API 20 NE.

Todas las bacterias no clasificadas como *Pseudomonas*, tanto si eran aglutinadas como si no con los sueros Anti-Ea y Anti-Eb, eran sembradas en el Medio OF de Hugh y Leifson, dando fermentación y probadas para catalasa (positiva) y oxidasa (negativa). Confirmados estos aspectos eran sembradas en las pruebas de identificación para *Enterobacteriaceae*, incluidos el Enterotube y el API 20 E.

2.5.3. Antibiógramas.

Los antibiógramas han sido realizados con las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* para estudiar si existe variabilidad en el patrón de resistencia-sensibilidad y también, una vez determinada una estable resistencia ante algunos antibióticos, para facilitar el aislamiento incorporando dichos antibióticos al medio de cultivo, convirtiéndolo en selectivo.

El método seguido para las pruebas de sensibilidad ante los antibióticos ha sido la prueba de difusión en disco, recomendada por la FDA, según Bauer et al. (1966), más conocida

por Método de Kirby-Bauer, que debe seguirse minuciosamente si se desean resultados exactos y reproducibles.

La preparación del inóculo se hace tomando con el asa de siembra 4 ó 5 colonias bien aisladas, suspendiéndolas en un medio líquido, como Caldo Nutritivo, e incubando a 25°C durante unas horas hasta la obtención de una opacidad visible. La turbidez del medio se compara y ajusta, si es necesario, con solución fisiológica estéril, al llamado estandar 0.5 de Mc Farland, preparado de la siguiente manera:

Ba Cl ₂ .2H ₂ O 0.048 M	-----	0.5 ml
H ₂ SO ₄ 0.36 N	-----	99.5 ml.

La siembra se hace con hisopo estéril, introduciendolo en el inóculo, rotando y presionando al sacarlo por las paredes del tubo para eliminar el exceso de caldo. El hisopo se pasa por toda la superficie del medio de cultivo (Agar Mueller Hinton), haciendo tres pasadas completas, girando la placa cada vez 60°, con el fin de asegurar una siembra en cespel uniforme.

Los discos con antibióticos (Bio Discs de Biomerieux, Dispens-O-Discs de Difco y Sensitivity Discs de Difco) son depositados sobre la superficie del Agar Mueller Hinton, dejándolos adherirse bien por capilaridad durante unos 15 minutos antes de invertir las placas y someterlas a incubación.

Tras la incubación, la lectura de los resultados se realiza midiendo en mms. el diámetro del halo de inhibición si existe, y consultando las tablas proporcionadas por cada fabricante.

2.5.4. Capacidad criogénica.

Para detectar la actividad formadora de núcleos de hielo, sin ninguna pretensión de cuantificar, preparamos suspensiones de 2×10^8 bacterias/ml., aproximadamente, en tampón fosfato 0.01 M a pH 7.0 (Lavermicola et al. 1987 b), poniéndolas en tubos de hemólisis (10X10) e introduciéndolas en el congelador de una nevera regulado a -5°C , aproximadamente. Observamos los resultados a los 15 y a los 30 minutos. (Figura 24).



Figura 24. Comprobación de la formación de núcleos de hielo. De izquierda a derecha: Control (tampón fosfato 0.01 M pH 7.0), *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps 1), Ea y Eb.

2.6. Estudio de la transmisión de la tuberculosis del olivo durante la recolección de la aceituna..

La recolección de la aceituna en la Comarca de

Navahermosa se realiza durante los meses de enero, febrero y marzo. En las temporadas 1985, 1986 y 1987 hemos tomado muestras de las varas que estaban empleando varias cuadrillas en la Raña de la Mascara para comprobar la transmisión, por ese medio, de *P. syringae* pv. *savastanoi*. También hemos tomado muestras de las gotas de rocío, habitual en esa época del año, a partir de los olivos.

Para realizar esta toma de muestras, preparabamos previamente en el laboratorio tubos con 10 ml. de tampón PBS pH 7.2 estéril en los que introducíamos un hisopo. Con el hisopo humedecido en tampón tomábamos muestras frotando sobre la superficie de las varas, e introduciendo finalmente el hisopo en el tampón. Estas muestras eran tomadas a partir de varas nuevas, con las que no se había realizado todavía ningún vareo en la temporada, y con varas que se estaban empleando.

A partir de cada tubo, con el hisopo correspondiente, escurrido presionando sobre las paredes, sembrabamos in situ en los medios de cultivo generales, selectivos y diferenciales empleados en el apartado 2.5., con gran asombro para los miembros de las cuadrillas.

Una vez en el laboratorio, a partir de cada tubo y empleando el hisopo, esta vez sin escurrir, se depositaba una gota en cada compartimento de portas FA Test Slides, se desecaba y fijaba a la llama, realizando una tinción con anticuerpos fluorescentes, como ya describimos en 2.2.4.

Las gotas de rocío pendientes de los árboles eran depositadas directamente en las placas con los medios de cultivo

y extendidas por toda la superficie empleando asa de siembra estéril.

2.7 Asociación de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* y otra flora tumoral a la mosca del olivo.

Durante los meses de noviembre y diciembre, buscábamos aceitunas que presentasen la marca típica de la puesta de *Dacus oleae*. Estas aceitunas eran llevadas al laboratorio, lavadas superficialmente con una solución de cloruro de benzalconio 1/1000 para eliminar la flora externa, y puestas en vasos estériles cubiertos por una gasa. Introducidas a incubar en estufa a 25°C, en unos días se producía la salida de las larvas, la transformación en pupas y, finalmente, en insecto adulto.

Las tres formas del insecto fueron investigadas para detectar la presencia y, por tanto, la transmisión transovárica de *P. syringae* pv. *savastanoi*:

- Las larvas eran sometidas a disección para aislar sus glándulas salivales, que eran sometidas a un aplastamiento entre porta y cubre, y teñidas con anticuerpos fluorescentes. Además, a partir de las glándulas salivales, hacíamos siembra en los distintos medios de aislamiento ya descritos.

- Las pupas eran cortadas con microtomo de congelación provisto de bala de dióxido de carbono, y los cortes teñidos con anticuerpos fluorescentes. También depositábamos pupas, en condiciones de esterilidad, sobre la tapa de placas con los medios de cultivo para el aislamiento, a fin de que, al emerger el insecto adulto fuese "sembrando" las bacterias que portase.

- El insecto adulto, anestesiado con eter, era puesto en

placas con los medios de aislamiento, para que "sembrase" como hemos apuntado más arriba.

2.8 Observaciones microscópicas de los tumores.

2.8.1. Cortes con microtomo de congelación.

Los tumores seleccionados en varias etapas de su desarrollo, eran fijados in situ empleando como fijador FAA (formaldehído-acético-alcohol), uno de los más empleados en estudios anatómicos y morfológicos vegetales, preparado de la siguiente manera (Curtis 1986):

Etanol de 95 ----- 50 ml.
 Acido acético glacial ----- 5 ml.
 Formaldehído de 37-40% ----- 10 ml.
 Agua ----- 35 ml.

El tiempo de fijación, en el caso de los tumores que pueden ser algo voluminosos, debe ser superior a las 24 horas.

Antes de realizar los cortes, es necesario lavar el fijador varias veces a lo largo de, al menos, 24 horas, para que éste no interfiera la congelación de la muestra.

Los cortes eran realizados con microtomo de congelación provisto de bala de dióxido de carbono, y teñidos con floroglucina clorhídrica, compuesta por:

1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucina) ----- 1 g.
 Agua ----- 100 ml.

Una vez disuelta la floroglucina en el agua se añade H Cl concentrado hasta observar precipitación y se somete a decantación.

La floroglucina clorhídrica tiñe las células lignificadas de color pardo-rojizo a rojo según el tiempo de tinción. Dicho tiempo puede oscilar entre 10-30 minutos.

Los cortes fueron observados y fotografiados con microscopio Nikon Optiphot .

2.8.2. Inclusión y cortes con microtomo de parafina.

La fijación del tejido a incluir la hemos realizado como en el apartado anterior, con FAA, pero sometiendo las piezas a desgasificación en vacío dos veces durante 15 minutos.

Para la deshidratación e imbibición hemos seguido la técnica de Jensen (1962).

La serie de alcoholes para la deshidratación, llamada serie TBA (tertiary butyl alcohol) , es una mezcla de alcohol butílico terciario, etanol y agua, en concreto:

- 50: Agua, etanol 95, a. butílico terciario (50:40:10)
- 70: Agua, etanol 95, a. butílico terciario (30:50:20)
- 85: Agua, etanol 95, a. butílico terciario (15:50:35)
- 95: Etanol 95, a. butílico terciario (45:55)
- 100: Etanol absoluto, a. butílico terciario (25:75)
- TBA: 100% de a. butílico terciario.

El número de las series indica la concentración total de alcohol de cada una.

Los tiempos de deshidratación fueron de 2 h. 30 m. para las series 50, 70, 85 y 95. En el de 100 se mantiene 24 h. y en el de TBA se somete a dos baños de 7 h. y 24 h.

La imbibición se realiza con los siguientes pasos:

- Tolueno: 3 baños de 1 h. 15 m.

- Parafina-tolueno (1:3): 40 m. a 65°
- Parafina-tolueno (1:1): 40 m. a 65°
- Parafina : 48 h., 6 h. y 24 h. a 65°

Los bloques eran cortados con microtomo de parafina, extendidos en baño histológico, los cortes recogidos con portas cubiertos con albúmina glicerizada de Mayer, puestos en estufa a 30° C durante 24 h., desparafinados en xileno durante 2 h. rehidratados en series de alcoholes en pasos de 10 minutos hasta llegar a agua.

Las tinciones fueron realizadas con floroglucina clorhídrica, como en el apartado anterior, y con safranina - verde de metilo. En este último caso teñíamos con safranina 30 minutos, diferenciábamos con etanol absoluto y contrastábamos con verde de metilo 30 minutos. (Curtis 1986, modificado).

2.8.3. Microscopía de fluorescencia.

Los cortes obtenidos en los apartados anteriores eran colectados en los compartimentos de portas FA test slides, teñidos con anticuerpos marcados con fluoresceína, como describíamos en III.2.2.4. lavados repetidas veces con tampón PBS pH 7.2, observados y fotografiados con microscopio Nikon Optiphot provisto de sistema de fluorescencia con lámpara halógena.

Cambiando el objetivo de fluorescencia por los de campo claro, sin mover la preparación, podíamos conocer la localización de las bacterias dentro de los tumores.

2.8.4. Microscopía electrónica. (Ascaso, C. 1988. Comunicación personal).

En primer lugar se elige cuidadosamente la localización del tumor que hay que observar. Conociendo la anatomía macroscópica de este elegimos, por un lado partes del tumor en las que no se encuentran las bacterias y, por otro, la zona correspondiente al canal de infección. Estas zonas fueron troceadas en pequeños bloques de unos 0.5 mm. de espesor que fueron fijados inmediatamente en glutaraldehído al 3.25% en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.1, sometidas a vacío durante 10 minutos, dos veces, para desgasificar, comprobando que habían dejado de flotar. Tras la desgasificación, las muestras se mantienen en el fijador en nevera durante 3 horas.

Pasado este tiempo se realizan 3 lavados en tampón fosfato para eliminar el glutaraldehído y se dejan las muestras en tampón en la nevera hasta el día siguiente.

Se elimina el tampón y se añade el segundo fijador, tetróxido de osmio al 1%, dejándolo actuar durante 3 horas en nevera. Transcurrido ese tiempo se lava varias veces con tampón fosfato antes de proceder a la deshidratación.

La deshidratación se hace con una serie de alcoholes a temperatura ambiente:

- Etanol de 30 durante 15 m.
- Etanol de 50 durante 15 m.
- Etanol de 70 durante 15 m.
- Etanol de 90 durante 30 m.
- Etanol absoluto durante 60 m. (3 veces).

La imbibición comienza con la sustitución del alcohol absoluto por oxido de 1,2-propileno durante 20 minutos (2 veces), pasando luego a oxido de 1,2-propileno-Spurr (Spurr, 1969) (Spurr Resin Kit Taab) 3:1, dejándolo destapado en un lugar seco durante 24 horas, con lo que se irá concentrando el Spurr. Finalmente se pasa a Spurr puro durante varios días en nevera para evitar la polimerización.

Para realizar la inclusión se ponen previamente los moldes de silicona en estufa a 70°C para que se encuentren deshidratados. Se elimina todo el Spurr sobrenadante de los tubos y las muestras se vacían en un papel de filtro colocado sobre un papel de aluminio, para poder eliminar completamente los restos de Spurr. Con una jeringa ponemos en cada molde una gota de Spurr y con las pinzas colocamos en cada uno una muestra, dándole la orientación deseada para el corte posterior. Finalmente se rellena cada molde con Spurr, algo en exceso puesto que en la polimerización sufre algo de contracción.

Los moldes se introducen en la estufa a 70°C para polimerizar durante 24 horas. Pasado ese tiempo se apaga la estufa, sin abrirla hasta que descienda a temperatura ambiente.

Los bloques son tallados con una cuchilla de afeitar dándoles forma de tronco de pirámide en la orientación precisa.

Se realizan cortes semifinos de 0.35 μ m. de espesor en ultramicrotomo Ultracut-E (Reicher-Jung) con cuchilla de vidrio hecha con 7800 Knifemaker (LKB) y se van observando a microscopía óptica hasta seleccionar la zona que se quiere observar. A continuación se hacen ya cortes ultrafinos de 80-

90 nm. de espesor con el mismo ultramicrotomo, pero esta vez con cuchilla de diamante.

Para teñir los cortes se emplea una solución de citrato de plomo a pH 12.6 (Solución de Reynolds) (Reynolds 1963), preparada previamente de la siguiente manera:

Se disuelven 3.5 g. de citrato trisódico en 60 ml. de agua bidestilada en matraz aforado de 100 ml. Se añaden 2.66 g. de nitrato de plomo, formándose un precipitado blanco mate que hay que agitar durante 30 minutos a intervalos de 5 minutos. Posteriormente se añaden 16 ml. de Na OH 1 N. Finalmente se afora a 100 ml. y se mezcla por inversión. La solución debe quedar completamente transparente y ajustado el pH, almacenándose de 0-4° C.

La tinción se realiza en presencia de Na OH en lentes para eliminar el dióxido de carbono ambiental, sobre papel de parafina en placa Petri cerrada. Se pone una gota de la solución de Reynolds y sobre la gota la rejilla con los cortes, colocando los cortes en contacto con la gota, invirtiendo la rejilla, durante 10-12 minutos. Finalmente se lava en agua bidestilada durante 5 minutos.

Para los cortes en los que aparecen bacterias hemos empleado también la tinción con acetato de uranilo, que contrasta mejor las estructuras subcelulares. Se emplean soluciones de acetato de uranilo al 2% en acetona del 70%, elevando el pH a 4-5 con Na OH. Las rejillas se flotan en la solución durante 2 ó 3 minutos y se lavan con agua bidestilada.

La observación se realiza con microscopio electrónico

de transmisión Philips EM 300.

2.9 Producción de ácido indol 3-acético.

2.9.1. Estimación colorimétrica (Método de Gordon y Weber. 1951)

Los autores de este método trabajaron con soluciones puras de AIA y compararon varias formas de obtener complejos coloreados para poder relacionar la absorbancia con la concentración.

Nosotros hemos modificado el método en el sentido de poder detectar el AIA en los medios de cultivo, haciendo una gráfica patrón para cada uno de los medios de cultivo empleado adicionado con AIA a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 $\mu\text{g/ml}$.

De las seis reacciones empleadas por Gordon y Weber para formar complejos coloreados, hemos elegido la que se realiza con una solución de Fe Cl_3 en H Cl O_4 por ser la que da una mejor resolución a bajas concentraciones.

El reactivo tiene la siguiente composición:

Fe Cl_3 0.5 M ----- 1 ml.

H Cl O_4 35% ----- 50 ml.

La reacción se efectúa poniendo en un tubo 1 ml. de la solución de AIA y 2 ml. del reactivo, agitando y dejando en reposo 25 minutos. Una vez alcanzado el máximo la densidad del color, esta permanece constante por al menos una tres horas, lo que da tiempo perfectamente a las lecturas en el espectrofotómetro.

El máximo de absorbancia para esta reacción nos daba

para $\lambda = 525 \text{ nm.}$, leído en "UV-VIS Spectrophotometer G-35" (Varian Techtron).

La gráfica patrón obtenida en estas condiciones la podemos ver en la Figura 25. que se corresponde con el medio de Glucosa y Peptona, empleado por Comai y Kosuge (1980), con concentraciones de hasta $50 \mu\text{g/ml.}$ de AIA.

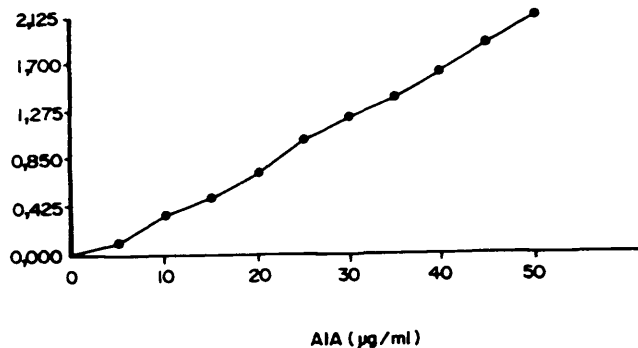


Figura 25. Gráfica patrón elaborada con el Medio de Glucosa y Peptona adicionado con concentraciones de $1-50 \mu\text{g/ml.}$ AIA.

Para detectar bajas concentraciones de AIA hemos elaborado también gráficas patrón con el medio de cultivo adicionando de $0-4 \mu\text{g/ml.}$, como la de la Figura 26.

Los medios de cultivo utilizados para detectar la producción de AIA por este método fueron: Medio de Glucosa y Peptona, Medio de Glucosa y Triptona, Caldo de Patata y Glucosa (Difco), Caldo de Patata y Glucosa (Natural), y Caldo Nutritivo.

En estos medios de cultivo sembramos 0.1 ml. de un precultivo de 24 horas en Caldo Nutritivo de las siguientes cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi*: Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, PsA,

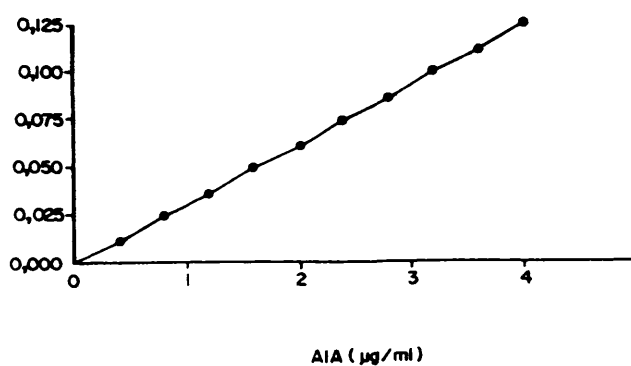


Figura 26. Gráfica patrón elaborada con el Medio de Glucosa y Peptona adicionado con concentraciones de 0-4 µg/ml. de AIA.

PsF y PsR. También sembramos las bacterias que aparecen asociadas a *Pseudomonas* en los tumores, las denominadas Ea y Eb. Todas ellas fueron incubadas en matraces de 250 ml., conteniendo 100 ml. de medio de cultivo, en baño de agitación en oscuridad a 25° C. A partir de cada cultivo tomábamos muestras de 1 ml. cada 24 horas para determinar la concentración de AIA.

2.9.2. Detección de AIA por HPLC.

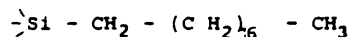
La cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography o HPLC) es una de las técnicas, tanto analítica como preparativa, más utilizada para compuestos orgánicos y biológicos. Por su exactitud y rapidez de los análisis es una técnica ideal para el estudio de la concentración de AIA, ya que este compuesto es altamente inestable.

El equipo que hemos empleado estaba compuesto por los siguientes elementos:

- Cromatógrafo de líquidos Konic KNK-500 G, provisto de bomba de doble émbolo que suministra caudales de 10 μ l, a 5 ml/min. , a presiones de 0-500 atms.
- Programador de gradientes KNK -029-375.
- Inyector Rheodyne 7125 con un loop de 20 μ l.
- Integrador Spectra-Physics SP 4290.
- Detector ERC - 7211 (Erma Inc.) con longitud de onda variable de 195-350 nm.

Teniendo en cuenta que lo que pretendíamos era que se nos separase en el cromatograma el AIA del resto de los ingredientes de los medios de cultivo y considerando la solubilidad de todos estos compuestos, había que elegir con mucho cuidado las condiciones, basándonos tanto en los aspectos teóricos reflejados en la bibliografía como en la experiencia práctica que íbamos probando día a día.

Especial atención dedicamos a la elección de la columna y el relleno ideal, ya que ello es el corazón del cromatógrafo. Nos inclinamos por la cromatografía en fase reversa, ya que, con este tipo de relleno, por ser hidrofobo, pasarían en los primeros momentos los ingredientes del medio de cultivo solubles en agua, quedando más retenido el AIA, que saldría al final, facilitándose así la separación. El relleno elegido fué el octadecilsililo (ODS) unido a una base microgranular de silica gel. Esta fase estacionaria expone al medio la siguiente estructura:



Al tratarse de una cadena hidrófoba de 18 átomos de carbono, los compuestos del medio de cultivo, más hidrófilos, eluirían inmediatamente al no ser retenidos, mientras que el AIA, menos hidrófilo, sería retenido, eluyendo al final. Por ello, la columna elegida fué una Spherisorb S5-ODS 1 (Phase Sep) con tamaño de partícula $5\mu\text{m.}$, 25 cm de longitud de columna y 4.6 mm. de diámetro. El bajo tamaño de partícula, al igual que la mayor longitud de la columna, aumentan la eficacia produciendo una mejor separación. El diámetro de la columna también es muy importante, ya que con diámetros de columna pequeños se utiliza menor cantidad de fase móvil y se logra la detección de menores concentraciones de muestra. Logicamente, estas consideraciones son válidas porque lo que pretendíamos era cromatografía analítica, no preparativa.

En la cromatografía sobre fase reversa, la fase móvil más habitual es una mezcla de agua con un disolvente miscible y menos polar, como metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc. El agua es el disolvente más débil, y origina los mayores tiempos de retención. Al aumentar la concentración del disolvente menos polar disminuyen los tiempos de retención. Además de estas consideraciones, la elección del componente menos polar de la fase móvil depende de la solubilidad de la muestra. Tras estas consideraciones teóricas y las correspondientes pruebas prácticas, nos inclinamos por una fase móvil compuesta por metanol : a acético al 1% en agua (50:50).

En el detector lo único que se regula es la longitud

de onda, puesto que la sensibilidad se controla con el integrador. La longitud de onda ideal, en este caso, es 280 nm., máximo de absorción del AIA.

El integrador, desde el que se controla el cromatograma, se programa, en principio para unas condiciones de trabajo medias y, según los resultados, se modifican dichas condiciones. La programación básica, para empezar, puede ser la siguiente:

- Evaluación del umbral del pico, peak threshold evaluation o "PT eval": debe estar entre 12 y 200, ya que valores superiores a 500 indicarían deriva en la línea base, elución de picos de un cromatograma anterior o sensibilidad demasiado elevada en el detector. Una vez dada correctamente esta "PT eval", se puede programar a un valor más alto, por ejemplo PT=1150.

- Atenuación: Se puede regular en valores múltiplos de 2, desde 0.5, 1, 2, 4, 8.... hasta 4096. En principio se puede establecer a un nivel AT=256.

- Velocidad del papel: regulable desde 0.1 hasta 20 cm/min. En este caso trabajamos a 0.5 cm/min.

Para empezar el cromatograma, primeramente hacemos pasar con patrón medido (AIA, Sigma) en las condiciones seleccionadas, como vemos en la Figura 27. A continuación, y siempre en las mismas condiciones, inyectamos el medio de cultivo estéril, centrifugado y filtrado con filtro de 0.2 μ m de diámetro de poro (Millex Memo, Millipore) (Figura 28.).

Muestra: AIA 195 ng/ml.

Inyección: 20 μ l.

Columna: Spherisorb S5-ODS 1

F. móvil: Metanol-Acético 1% (50:50)

Flujo: 1 ml./min.

Detector uv: $\lambda = 280$ nm.

PT= 1150

AT= 256

CHT SP= 0.5

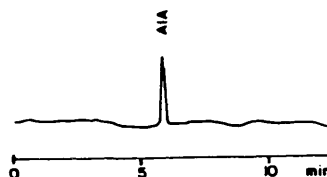


Figura 27. Cromatograma del patrón AIA (195 ng/ml.)

De esta forma nos aseguramos de que el pico correspondiente al patrón no coincide con ninguno de los del medio de cultivo. En este ejemplo hemos elegido a propósito el Medio de Glucosa y Peptona por ser el más complejo en cuanto a picos de cromatograma. Finalmente, inyectamos el medio de cultivo con cantidades variables del patrón, repitiendo varias veces la inyección de cada concentración de AIA para calibrar bien la relación del área del pico, dato que nos proporciona el integrador, con la concentración. En las Figuras 29 y 30 vemos los cromatogramas del Medio de Glucosa y Peptona con 100, 200 y 400 ng/ml. de AIA.

Una vez que ya sabemos en que punto y tiempo de retención eluye el patrón, hacemos un nuevo programa para el integrador, de forma que no nos integre ningún área salvo el pico que nos interesa, que dé máxima atenuación a todas las zonas del cromatograma que no van a ser integradas, que



Figura 28. Cromatograma del Medio de Glucosa y Peptona en las mismas condiciones que el anterior.



Figura 29. Cromatograma del Medio de Glucosa y Peptona con 100 ng/ml. de AIA, en las mismas condiciones.

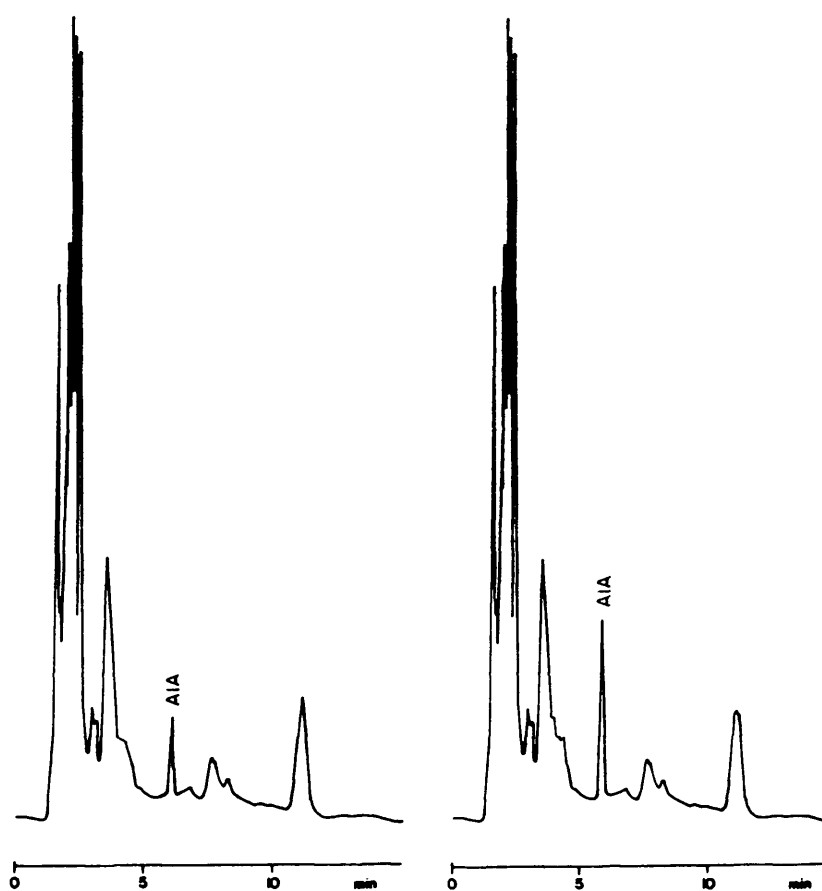


Figura 30. Cromatogramas del Medio de Glucosa y Peptona con AIA a concentraciones de 200 ng/ml (izquierda) y 400 ng/ml (derecha), en las mismas condiciones de los casos anteriores.

disminuya la atenuación en el pico a integrar y, finalmente, que termine de imprimir a un tiempo en el que ya no eluye ningún pico. Este programa, en el caso que estamos estudiando sería:

```

FILE NAME = AIA EN GP

TIME          FUNCION          VALUE
TT = 0.01     TF = "AZ         TV = 1
TT = 0.02     TF = "AT         TV = 4096
TT = 0.03     TF = "II         TV = 1
TT = 4.49     TF = "AZ         TV = 1
TT = 4.5      TF = "AT         TV = 64
TT = 4.51     TF = "II         TV = 0
TT = 6.20     TF = "II         TV = 1
TT = 6.21     TF = "AT         TV = 4096
TT = 11       TF = "ER         TV = 1

METHOD NUMBER: MN = 0

```

Las modificaciones introducidas para los siguientes cromatogramas son:

- En el tiempo 0.01 (TT = 0.01) hacer auto-cero (TF = AZ), por si la linea base no estuviera ajustada, TV = 1 significa que la función citada queda activada.

- En el tiempo 0.02, poner la atenuación a su valor máximo (TF = AT, TV = 4096).

- En el tiempo 0.03, inhibir la integración (TF = II, TV = 1).

- En el tiempo 4.49, volver a hacer auto-cero (TF = AZ, TV = 1) para que el pico a detectar aparezca a partir de la linea base.

- En el tiempo 4.5, bajar la atenuación a 64 (TF = AT, TV = 64), de forma que el pico correspondiente al AIA será cuatro veces superior al obtenido en los anteriores cromatogramas.

- En el tiempo 4.51, eliminar la inhibición de la integración (TF = II, TV = 0), empezando a integrar el siguiente pico.

- En el tiempo 6.20, una vez eluido el AIA, volver a inhibir la integración (TF = II, TV = 1).

- En el tiempo 6.21, volver a la máxima atenuación (TF = AT, TV = 4096).

- En el tiempo 11 finalizar la impresión (end run) del cromatograma (TF = ER, TV = 1).

El número de método (MN = 0) elegido es el que nos valora las concentraciones por el área de los picos.

En estas condiciones de trabajo, la misma muestra de la Figura 29, el Medio de Glucosa y Peptona con 100 ng/ml. de AIA, nos daría el cromatograma representado en la Figura 31.

Una vez creadas todas estas condiciones para cada uno de los medios de cultivo en los que se va a detectar la producción de AIA, ya se pueden ir tomando muestras de estos que, centrifugadas y filtradas, pueden ser cromatografiadas.

Los medios de cultivo empleados para el estudio de la producción de AIA por HPLC fueron: Medio de Glucosa y Peptona, Medio de Glucosa y Triptona, Caldo de Patata y Glucosa (Difco), Caldo de Patata y Glucosa (Natural) y Caldo Nutritivo. En todos estos medios de cultivo sembramos las siguientes bacterias: Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, IF 3026, PsA, PsF y PsR. Todas ellas fueron

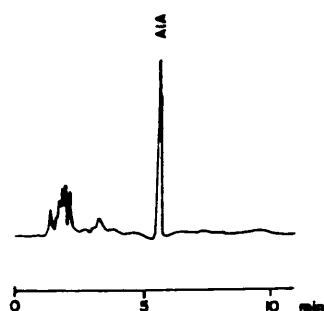


Figura 31. Cromatograma del Medio de Glucosa y Peptona en las condiciones detalladas en el texto.

preincubadas en Caldo Nutritivo durante 48 horas a 25° C y sembradas, tomando 100 μ l. con pipeta automática, en los medios anteriormente citados. Cada cultivo estaba compuesto por 10 ml. del medio correspondiente, en tubos de 16 X 16 , que eran incubados en agitación a 25°C en oscuridad. Las muestras, de 1 ml. cada vez, se tomaron en condiciones de esterilidad a las 18, 41, 64, 96, 114, 121, 145 y 168 horas, se centrifugaron, en tubos Ependorf con Microfuge Beckman, se filtraron y cromatografiaron.

También fueron cromatografiadas muestras de cada uno de los precultivos en Caldo Nutritivo, por si la detección de AIA en las primeras horas se debiera a la dilución normal del inóculo.

2.10. Producción de Siringomicina.

2.10.1. Métodos de Gross y De Vay (1976, 1977, 1985) modificados

Para la producción de Siringomicina (SR) hemos empleado todos los medios líquidos ya descritos para la detección de AIA. En ellos hemos sembrado las mismas cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* que en el caso anterior.

También hemos obtenido SR a partir de tumores frescos, en periodo de crecimiento, a partir de retama, olivo, adelfa y fresno.

Los cultivos, 250 ml. de medio en matraces de 500 ml., eran sembrados con 1 ml. de un precultivo de 48 h. en Caldo Nutritivo de cada Bacteria, e incubados a 25°C durante 5 días. Tras esa incubación, se añadía a cada cultivo un volumen igual de acetona acidificada con HCl 12 N. Se centrifugaba en centrífuga refrigerada (Centrifuga RC-5, Sorvall) a 4°C, a 12.000 r.p.m. durante 20 minutos, para eliminar las bacterias.

En el caso de los tumores, eran triturados y puestos en maceración con acetona durante 4 horas, añadiendo 200 ml. de acetona por cada 100 g. de tumores, se decantaba, y se centrifugaba en las mismas condiciones que los cultivos. A partir de aquí se seguía el mismo procedimiento que con los cultivos.

Los sobrenadantes de los dos casos eran recogidos y concentrados en rotavapor (Buchi) hasta 50 ml. a 50°C. Se ajustaba el pH a 2.0 y se extraía tres veces con igual volumen de n-butanol. Los tres extractos butanólicos eran mezclados y reajustados al 50% con agua destilada y concentrados.

El concentrado final se ajustaba a 4 ml. en H Cl pH3 y se sometía a diluciones doble progresivas doce veces para ensayar su actividad antibiótica. (Sinden et al. 1971).

El extracto en H Cl pH3 se aplica, sobre una columna de cambio ionico de carboximetil celulosa (CM 52 Whatman), preciclada, desgasificada y equilibrada con H Cl pH3. Tras la aplicación de la muestra, se pasan 250 ml. de H Cl pH3 y, a continuación, diez cantidades de 50 ml. de soluciones de H Cl diferenciándose en 0.1 unidades de pH, desde pH 2.9 hasta pH 2.0. Recogiamos fracciones de 5 ml., que eran individualmente concentradas en rotavapor y probadas en su actividad antibiótica.

Además de columnas de carboximetil celulosa CM-52, hemos empleado otras de fosfoceululosa P 11 (Whatman) en las mismas condiciones y con similares resultados.

Las muestras positivas procedentes del paso anterior eran purificadas a través de una columna de Sephadex G-15 (Pharmacia), concentrando fracciones y ensayando actividad como en el caso precedente.

Las pruebas de actividad antibiótica de la SR se hacen sobre *Geotrichum candidum* (Gross et al. 1977) sembrando en césped en la superficie de Agar Glucosado con Patata. Se define la unidad de actividad de SR como la cantidad en un punto final de dilución, que inhibe completamente el crecimiento de *Geotrichum candidum* en el área de aplicación de 10 μ l en Agar Glucosado con Patata (Sinden et al. 1971).

Aparte de estas pruebas clásicas, hemos realizado

otros métodos de ensayo de actividad antibiótica, como los que describimos a continuación:

- Poniendo determinadas concentraciones de los distintos extractos con SR sobre disco de 0.5 mm. de diámetro hechos con las almohadillas de papel de filtro que contienen las membranas de filtración Millipore de 0.45 m. Estos discos se han empleado de forma similar a los de Antiblograma sobre otros microorganismos (*G. candidum*, *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*) en Agar Glucosado con Patata y en Agar de Mueller Hinton.

- Practicando pocillos en placas de Agar Glucosado con Patata, sembrando *G. candidum* sobre la superficie y depositando en el pocillo el extracto.

- Al igual que en el caso anterior, haciendo pocillos en el Agar Glucosado con Patata, sembrando *G. candidum* en superficie y poniendo en los pocillos cultivos en Caldo de Patata y Glucosa de las bacterias productoras de SR.

- Sembrando *G. candidum* sobre Agar de Mueller Hinton y depositando en la superficie 20 μ l. de los cultivos bacterianos centrifugados y filtrados. En este caso, como la concentración de la fitotoxina era muy baja, utilizabamos el Agar de Mueller Hinton porque en este medio se difunde mejor.

Ninguno de estos últimos métodos descritos tiene valor cuantitativo, pero son muy prácticos para ir valorando cualitativamente la actividad antibiótica de la SR en los cultivos a diferentes tiempos, en distintos medios de cultivo y en los extractos varios que se van obteniendo.

2.10.2 Detección de Siringomicina por HPLC.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la hemos empleado para comprobar la efectividad de la purificación de la SR.

La fitotoxina obtenida según describíamos en el apartado anterior, tomada del tubo de máxima actividad procedente de la filtración con Sephadex G-15, nos daba un único pico a una longitud de onda de 254 nm. en un cromatógrafo de HPLC isocrático Kontron, empleando una fase móvil de metanol-agua (85:15), con un flujo de 0.5 ml/min. en columna Spherisorb S5-ODS 2, como vemos en la Figura 32.

De esta forma ya disponíamos de un patrón para cromatografiar en tales condiciones los diferentes extractos y eluidos. Así, por ejemplo, en la misma Figura 32, vemos a la derecha el cromatograma de un cultivo de Ps 1 en Agar Glucosado con Patata (Natural), tratado con acetona, centrifugado y filtrado, antes de la concentración, en el que se observa el pico correspondiente a la SR.

Cuando pudimos disponer, finalmente, de un detector ultravioleta de longitud de onda variable, comprobamos que en realidad la SR absorbía en ultravioleta a un máximo de 210 nm. como vemos en la Figura 33 que representa un cromatograma de uno de los tubos de máxima actividad obtenido por elución de extractos concentrados de SR en fosfocelulosa P-11.

Con estas experiencias ya disponíamos de un método para detectar la SR, siempre que lográsemos las condiciones adecuadas para separar en una mezcla el pico correspondiente.

F. móvil: Metanol-agua (85:15)
Inyección: 10 μ l. de muestra
diluida en 10 μ l. de F. Móvil.
Columna: Spherisorb S5-ODS 2
Flujo: 0.5 ml/min.
Detector uv: λ = 254 nm.
Registro: 20 cm/h.

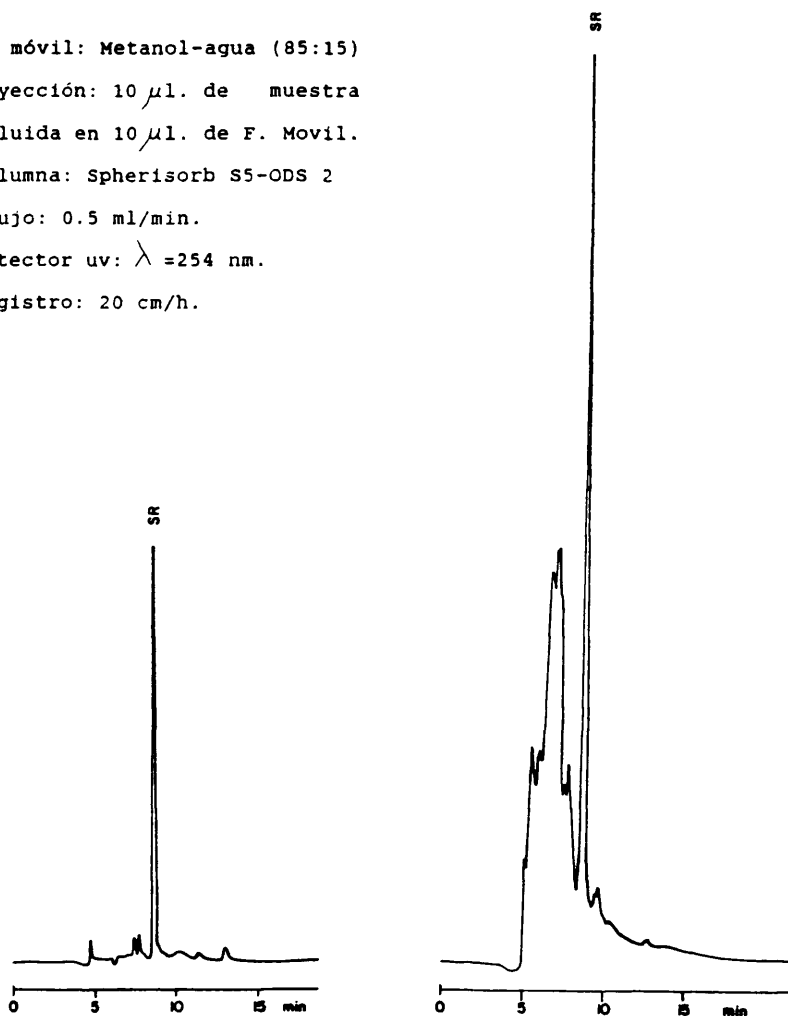


Figura 32. Cromatogramas de la SR (izquierda) y de un extracto acetónico de un cultivo de 5 días en Caldo de Patata y Glucosa (derecha), en las condiciones reseñadas en el texto.

Muestra: SR eluida de P11
F. móvil: Metanol-agua (50:50)
Inyección: 20 μ l.
Columna: Spherisorb S5-ODS 1
Flujo: 1 ml/min.
Detector uv: $\lambda = 210$ nm.
PT = 1.150
AT = 128
CHT SP = 0.5

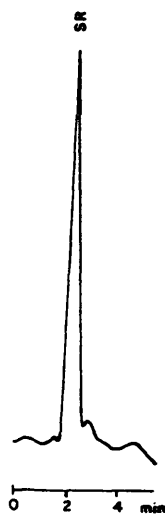


Figura 33. Cromatograma de SR eluida en columna de fosfocelulosa P-11.

IV. RESULTADOS

- En Agar Nutritivo con 25 mg/l. de Cristal Violeta, las colonias de *Pseudomonas* crecen menos que en los medios anteriores, alcanzando un máximo de 0.5 mm. de diámetro, captando el colorante. Las *Enterobacteriaceae* crecen igual que en Agar Nutritivo, pero camuflándose algo el pigmento de las cepas amarillas. (Figura 35.)

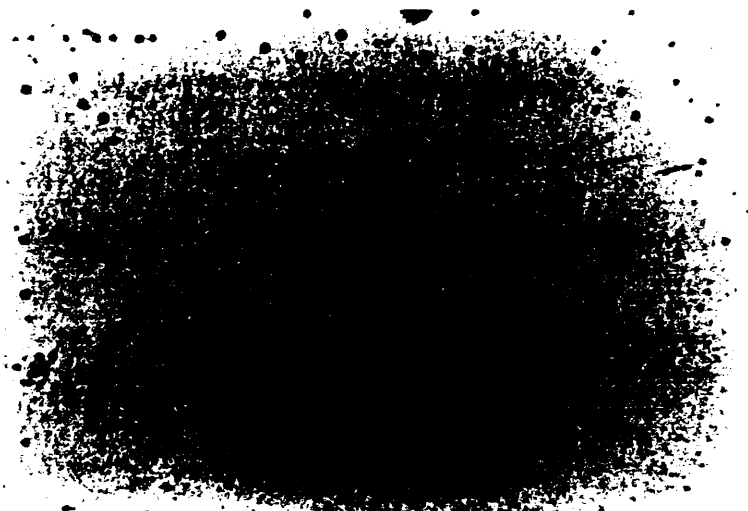


Figura 35. Siembra de tumores de olivo en Agar Nutritivo con 25 mg/l. de Cristal Violeta. Las colonias amarillas son *Enterobacteriaceae* y las violeta *P. syringae* pv. *savastanoi*.

- En el Medio B de King, el crecimiento de todas las bacterias de los tumores se ve favorecido, alcanzando las cepas de *Pseudomonas* un diámetro de colonia de unos 2 mm. La producción de pigmentos fluorescentes es variable, no sólo a nivel de cada muestra sembrada, sino también, dentro de cada muestra, a nivel de individuo, apareciendo en la misma placa

colonias pigmentadas y no pigmentadas, probablemente debido a las diferencias individuales en determinados momentos en cuanto al contenido en hierro (Cody et al. 1987 a). Las *Enterobacteriaceae* llegan a alcanzar más de 5 mm. de diámetro, siendo sus colonias muy características, produciendo una abundante cápsula (detectable por tinción negativa) y conservando su pigmentación típica. (Figura 36.)

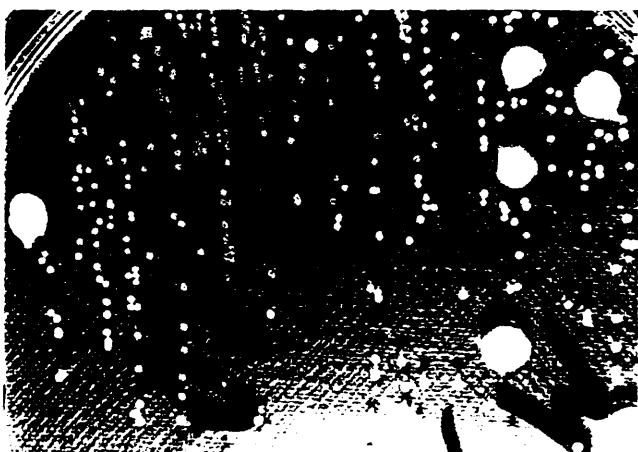


Figura 36. Siembra de tumores de olivo en Medio B de King. Las colonias grandes blancas son *Enterobacteriaceae* y las colonias pequeñas son *P. syringae* pv. *savastanoi*.

- En el Medio D4 de Kado y Heskett (1970), a pesar de su definición como medio selectivo para *Pseudomonas* fitopatógenas, ha demostrado ser muy poco práctico para este propósito. Sólo crecen las *Pseudomonas* procedentes de

determinados tumores, siempre en más bajas proporciones que en los medios anteriores. Este hecho nos indica ya una cierta variabilidad de *P. syringae* pv. *savastanoi*. A pesar de que todas las cepas estudiadas han resultado ser resistentes a los β -lactámidos, cuando este medio es adicionado con Ampicilina, no se da ningún crecimiento de *P. syringae*. Este hecho debe ser interpretado como que uno de los ingredientes del medio, el lauril sulfato sódico, por su carácter detergente, debe producir modificaciones en los lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared y facilitar el paso de la Ampicilina para que actúe sobre la transpeptidación. Por el contrario, la adición de Ampicilina al Agar Nutritivo o al Medio B de King, permite el normal crecimiento de la bacteria.

El crecimiento de *P. syringae* en este medio, cuando ocurre, produce colonias de 1-2 mm. de diámetro, blancas convexas y mucosas.

Las Enterobacteriaceae presentes en los tumores producen colonias grandes, de más de 5 mm., muy mucosas, abombadas, brillantes, conservando la pigmentación característica. (Figura 37.)

- El Medio D3 de Kado y Heskett (1970), selectivo para *Erwinia*, lo hemos empleado como prueba de que las Enterobacteriaceae, asociadas a los tumores, pertenecieran a dicho género, ya que las cepas de *Agrobacterium* sembradas en este medio no crecieron ninguna. Por el contrario, toda la flora tumoral, excepto *P. syringae*, crece bien, al igual que ocurre con las cepas de *Erwinia* probadas. (Figura 38).



Figura 37. Siembra de tumores de olivo en Medio D4. Las colonias grandes son Enterobacteriaceae y las colonias pequeñas son *P. syringae* pv. *savastanoi*.

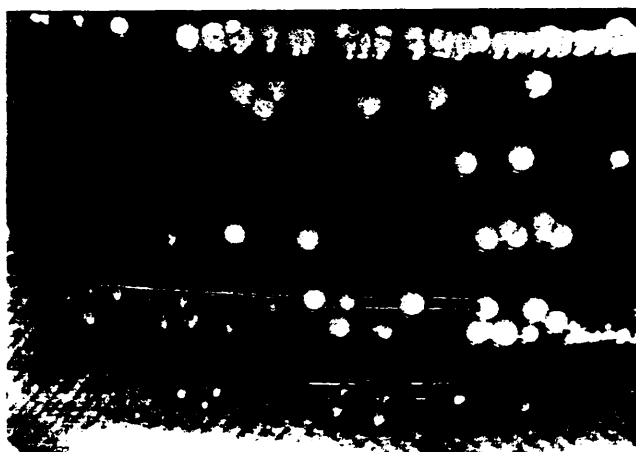


Figura 38. Enterobacteriaceae tumoral en Medio D3.

- El Medio D1 de Kado y Heskett (1970), selectivo para *Agrobacterium*, lo hemos usado con el mismo sentido que el anterior, pudiendo comparar la diferencia de crecimiento que hay en él entre *Agrobacterium*, *Erwinia* y las *Enterobacteriaceae* tumorales. Mientras que *Agrobacterium* crece en este medio sin virar el indicador azul de bromotimol, dando colonias azul o azul-verdoso, *Erwinia* hace virar el indicador a amarillo. Las *Enterobacteriaceae* tumorales se comportan igual que *Erwinia* en cuanto a la formación de colonias amarillas, pero sus colonias son mucho más grandes, de similares características a las producidas en los Medios B de King, D4 y D3. (Figura 39.)



Figura 39. *Enterobacteriaceae* tumoral en Medio D1.

Todos los caracteres de crecimiento en los diferentes medios que acabamos de describir para la flora tumoral de Olea

europaea, los tiene en común con los tumores estudiados en acebuche (*Olea europaea* var *sylvestris*).

Para comprobar si existía alguna relación numérica entre la presencia en los tumores de *P. syringae*, y los dos tipos de colonias de Enterobacteriaceae, blancas y amarillas, hicimos un muestreo de 50 tumores frescos de, aproximadamente el mismo peso (alrededor de 1 g.), procedentes de cinco olivares de la Raña de la Mascara.

Una vez machacados (los tumores) como describíamos en III.2.1., poníamos en el mortero 10 ml. de solución fisiológica y sembrábamos con asa calibrada de 10 μ l. en placas de Medio B de King de 140 mm. Los resultados de los recuentos fueron:

Número de colonias

Muestra	<i>P. syringae</i>	Enterobacteriaceae (Amarilla)	Enterobacteriaceae (Blanca)
Olivar 1.			
1	35	62	12
2	127	78	0
3	52	128	0
4	87	58	23
5	105	42	13
6	82	158	15
7	65	20	0
8	132	47	2
9	83	0	105
10	Incontables	Incontables	0

Olivar 2.

1	48	22	0
2	52	0	39
3	111	54	0
4	215	0	0
5	67	13	0
6	92	15	17
7	157	0	0
8	42	0	83
9	Incontables	Incontables	0
10	63	57	0

Olivar 3

1	98	81	0
2	105	68	13
3	67	121	0
4	85	72	0
5	63	24	19
6	Incontables	Incontables	0
7	32	158	0
8	49	33	13
9	162	0	0
10	78	23	0

Olivar 4

1	Incontables	Incontables	0
2	152	39	0
3	35	48	24
4	99	0	37

5	123	14	0
6	59	82	0
7	48	107	0
8	Incontables	0	0
9	62	14	15
10	34	22	0

Olivar 5.

1	115	0	0
2	27	38	0
3	52	0	47
4	64	11	16
5	82	37	0
6	29	75	0
7	41	62	0
8	30	17	18
9	20	98	0
10	29	26	0

Como puede observarse a simple vista, y sin emplear medidas estadísticas especiales, no hay ninguna relación entre la existencia de una u otra cepa de *Enterobacteriaceae* acompañando a *P. syringae*, puesto que hay tumores en los que aparece *Pseudomonas* sólo (10%), otros en los que va acompañada de las cepas amarillas de *Enterobacteriaceae* (54%), unos en los que aparecen simultáneamente *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae* blancas (10%), y, finalmente, tumores en los que nos encontramos los tres microorganismos (26%). Hay un claro predominio de

tumores en los que aparecen *Pseudomonas* junto con *Enterobacteriaceae* amarillas.

En experiencias similares a estas, cuyos cuadros de datos omitimos por no recargar demasiado estos resultados, hemos tratado de estudiar la existencia de los tres microorganismos en un mismo árbol y en ramas del mismo árbol.

En tumores procedentes del mismo árbol los resultados resumidos han sido:

- Tumores con *P. syringae* sólo: 5%
- Tumores con *P. syringae* y *Enterobacteriaceae* amarilla: 61%
- Tumores con *P. syringae* y *Enterobacteriaceae* blanca: 6%
- Tumores con los tres microorganismos: 28%

En tumores procedentes de la misma rama:

- Tumores con *P. syringae* sólo : 7%
- Tumores con *P. syringae* y *Enterobacteriaceae* amarilla: 68%
- Tumores con *P. syringae* y *Enterobacteriaceae* blanca: 13%
- Tumores con los tres microorganismos: 12%

Cuando hemos efectuado pruebas de patogeneidad inoculando los microorganismos procedentes de los tumores en chupones nacientes del tronco del árbol, hemos podido demostrar que sólo *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* era capaz de desencadenar la formación de tumores (Figura 40). Para asegurarnos de que en el inóculo iba solo la bacteria elegida, lavabamos previamente la zona a inocular con cloruro de benzalconio al 1/1000, de forma que eliminásemos la flora epifítica que pudiera contaminar. Pues bien, aún en estas condiciones, una vez desarrollados los tumores experimentales y

obtenidas de nuevo las bacterias presentes en él, nos encontramos la misma situación que en los tumores naturales, es decir, un predominio de flora mixta.

Las pruebas de patogeneidad realizadas con cepas *P. syringae* pv. *savastanoi* procedente de *Olea europaea* sólo han resultado efectivas claramente sobre la misma especie, independientemente de la variedad. Como ya hemos señalado, de las dos variedades cultivadas en la Zona Centro, la variedad Cornicabra y Manzanilla, la primera es la realmente afectada por la tuberculosis, mientras que la segunda no es atacada o, en caso de que lo sea, aparecen poquísimos tumores, muy aislados, en cada árbol. Pues bien, al realizar las inoculaciones experimentales, ambas variedades han respondido de la misma forma, siendo la respuesta positiva en todos los casos y cuantitativamente equiparable (Figura 41). Ello nos indicaría que el hecho de que una variedad sea más resistente a la enfermedad no se debe a ningún tipo de incompatibilidad entre los tejidos de la planta y la bacteria, sino más bien a algún tipo de impedimento físico a la penetración. Por eso, una vez vencido artificialmente dicho impedimento mediante la inyección experimental, el desarrollo de la enfermedad es igual en ambas variedades.

Las pruebas de patogeneidad sobre otras plantas sensibles en condiciones naturales (*Nerium oleander*, *Fraxinus excelsior* y *Retama sphaerocarpa*) han resultado negativas. Únicamente en *Nerium oleander* se detectaba un pequeño incremento de volumen en los tallos inoculados, sin llegar a desarrollarse



Figura 40. *Olea europaea*, variedad Cornicabra, inoculada artificialmente con *P. syringae* pv. *savastanoi*.

77750433



Figura 41. *Olea europaea*, variedad Manzanilla, inoculada artificialmente con *P. syringae* pv. *savastanoi*.

un tubérculo típico.

También hemos realizado pruebas de patogeneidad con plantas que pudieran mantenerse en el laboratorio, como *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicum esculentum*. En el primer caso, el porcentaje de efectividad ha sido muy bajo, descartándose por ello su uso continuo. No obstante en los casos en que conseguía desarrollarse el tumor, este era un tubérculo similar al que aparece en otras plantas afectadas (Figura 42). En el segundo caso, la efectividad era total, aunque el desarrollo tumoral era claramente distinto de los demás casos, produciéndose metástasis por todo el tallo, fuera del lugar de la inoculación y de menor desarrollo que en el caso anterior (Figura 43). En ninguno de estos dos ejemplos citados, al tratar

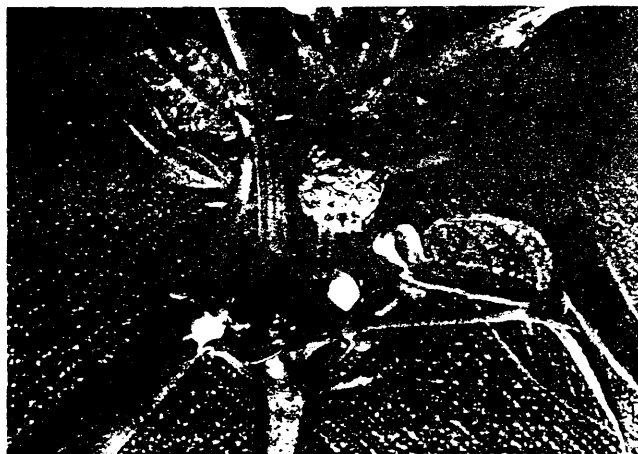


Figura 42. *Phaseolus vulgaris*, inoculada con *P. syringae* pv. *savastanoi*.



Figura 43. *Lycopersicum esculentum* inoculada con *P. syringae* pv. *savastanoi*.

de recuperar la bacteria inoculada a partir de los tumores experimentales, obteníamos ningún otro microorganismo.

Finalmente, una vez puesta a punto la técnica para la detección de la producción de AIA en los cultivos por HPLC, sustituimos las pruebas de patogeneidad por inoculación en la planta por la cromatografía de cultivos, ya que, en este último caso teníamos resuelta la prueba de patogeneidad en 24 - 48 horas.

1.2. Flora bacteriana asociada a tumores en otras plantas sensibles a *P. syringae* pv. *savastanoi*.

Tres son las plantas en las que hemos realizado un análisis de su flora bacteriana. Las dos primeras (*Nerium*

oleander y *Fraxinus excelsior*) ya se encontraban en la bibliografía, como vimos en la Introducción (Smith 1920, Wilson 1965, Janse 1981 a, 1981 b y 1992), mientras que la tercera (*Retama sphaerocarpa*) se describe aquí por vez primera.

En los tumores de *Nerium oleander* nos hemos encontrado una situación parecida al caso de *Olea europaea* ya que, en la mayor parte de los casos, *P. syringae* pv. *savastanoi*, aparece acompañada de bacterias de pigmentación amarilla. Estas bacterias, en base a los mismos criterios bioquímicos que en el caso anterior, fueron clasificados, en principio como *Enterobacteriaceae*. Por el contrario, en tumores de *Nerium oleander*, muy raramente aparecía alguna *Enterobacteriaceae* blanca. Todas las características de cultivo señaladas para las cepas procedente de *Olea europaea* son aplicables a este caso, con la excepción de que en Agar Nutritivo y Medio B de King, las cepas de *Pseudomonas* de *Nerium oleander* producen colonias algo más grandes (Figuras 44 y 45).

En *Fraxinus excelsior*, al igual que ocurre en *Olea europaea*, nos encontramos también a *Pseudomonas* acompañada por *Enterobacteriaceae* con colonias blancas y amarillas, en principio, con los mismos caracteres culturales descritos. Aparte de las diferencias bioquímicas que describiremos más adelante, hemos podido constatar que las cepas de *Pseudomonas* procedentes de esta planta crecen más rápidamente en los medios habituales, Agar Nutritivo y Medio B de King, produciendo colonias ya a las 24 horas. (Figuras 44 y 45).

En *Retama sphaerocarpa*, hemos obtenido una cepa de

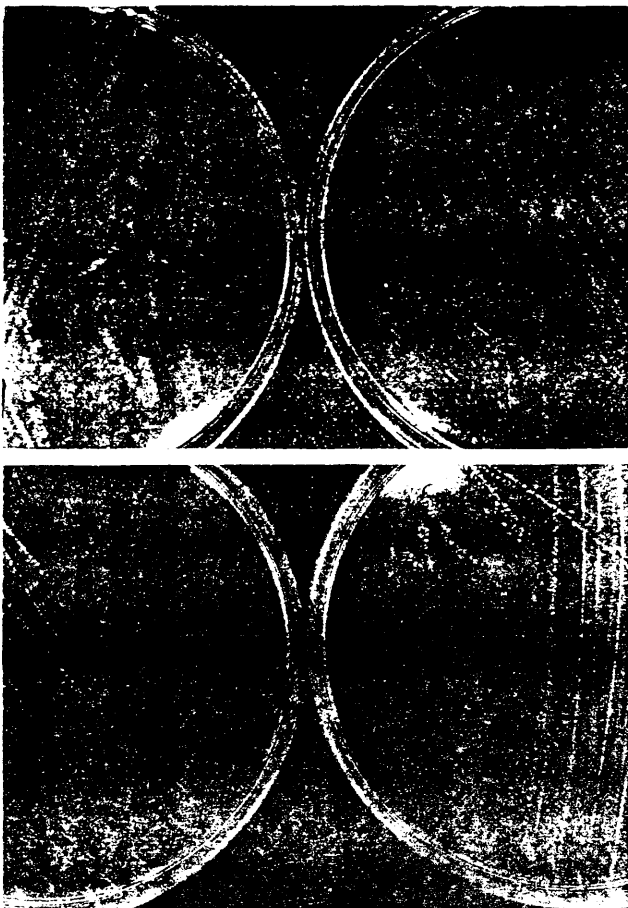


Figura 44. Crecimiento de diferentes cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* en Agar Nutritivo.

- Superior derecha: procedente de olivo.
- Superior izquierda: procedente de fresno.
- Inferior derecha: procedente de adelfa.
- Inferior izquierda: procedente de retama.



Figura 45. Crecimiento de diferentes cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* en Medio B de King.

- Superior derecha: procedente de olivo.
- Superior izquierda: procedente de fresno.
- Inferior derecha: procedente de adelfa.
- Inferior izquierda: procedente de retama.

Pseudomonas, que pudimos clasificar posteriormente como *P. syringae* pv. *savastanoi*, ya que no encontramos diferencias más notables que las que pudieran darse entre las tres primeras. La diferencia más destacable a primera vista, a nivel de cultivo en los Medios B de King y Agar Nutritivo, es su menor crecimiento, siendo este más lento y produciendo colonias más pequeñas (Figuras 44 y 45). Además esta cepa presenta un menor vigor para su conservación en cultivos refrigerados, ya que, mientras las tres anteriores pueden permanecer en nevera a 4°C en medios de agar durante más de un mes sin resembrar, esta necesita ser resembrada cada quince días aproximadamente. En cuanto a otras bacterias acompañantes, en *Retama sphaerocarpa* nos hemos encontrado en la mayoría de los casos la existencia de *Enterobacteriaceae* de colonias amarillas, no así de colonias blancas. Ocasionalmente han aparecido en los cultivos cepas de *Xanthomonas*, probablemente *X. campestris*, diferenciándose de las *Enterobacteriaceae* no solo en las pruebas bioquímicas, sino también por producir colonias mucho más pequeñas y nunca mucosas, en los medios habituales.

1.3. Análisis de la variabilidad de *P. syringae*.

Para analizar la variabilidad fenotípica de *P. syringae* hemos seleccionado 100 cepas procedentes de varias localizaciones geográficas (Raña de la Mascara, Río Cedená, Méntrida, Villaviciosa de Odón, Montepríncipe, Carretera de Boadilla del Monte, Madrid y Benidorm), distintas en cuanto a las plantas sobre las que se han encontrado en formaciones tumorales o como epifitas (*Olea europaea* var *europaea*, *Olea*

europaea var sylvestris, Nerium oleander, Fraxinus excelsior y Retama sphaeocarpa) y, finalmente., algunas obtenidas apartir de la mosca del olivo (Dacus oleae).

Las pruebas realizadas han sido todas las descritas para **Pseudomonas** en Materiales y Métodos, además de antibiogramas y pruebas de patogeneidad (producción de AIA y Siringomicina).

Vamos a ver a continuación todos los caracteres que hemos encontrado comunes en las cien cepas estudiadas, de forma que no compliquemos demasiado un cuadro que debería constar de 100 líneas y 64 columnas.

Reacciones de aglutinación:

* Anti Ps1 + * Anti PsA +

Pruebas bioquímicas básicas:

* Glucosa (Oxidación) +	* Glucosa (Fermentación) -
* Catalasa +	* Oxidasa -
* Nitrato (reducción) -	* Nitrógeno -
* Arginina dihidrolasa -	* Indol -
* β -Galactosidasa -	* Sulfhídrico -
* Urea -	

Asimilación de fuentes de carbono:

* Manosa +	* Manitol +
* Maltosa -	* Gluconato +
* Adipato -	* Malato +
* Fenilacetato -	* Galactosa -
* Adonitol -	* Inositol +
* Ramnosa -	* Fructosa +



- | | |
|--------------------------|--------------|
| * N- Acetilglucosamina - | * Almidón - |
| * Rafinosa + | * Dulcitol - |
| * Salicina - | * Xilosa + |

Otras pruebas:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| * Producción de AIA - | * Producción de levano + |
| * Producción de Siringomicina + | * Crecimiento a 41° C - |
| * Capacidad criogénica + | |

Sensibilidad ante antibióticos:

- | | |
|------------------|----------------|
| - Estreptomicina | - Kanamicina |
| - Neomicina | - Tetraciclina |
| - Oxitetraclina | - Colistina |
| - A. Nalidíxico | - Polimixina B |
| - Cloranfenicol | |

Resistencia a antibióticos:

- | | |
|---------------|---------------|
| - Bacitracina | - Furadoina |
| - Vancomicina | - Novobiocina |
| - Ampicilina | - Cefalotina |
| - Nistatina | |

Aquí debemos destacar el hecho de que aunque deducimos con caracter general la resistencia de todas las cepas aisladas ante los β -lactámidos (Ampicilina, Cefalotina), lo que hemos utilizado para elaborar medios selectivos con Ampicilina, una de las bacterias estudiadas, la llamada Psl, actualmente se ha hecho sensible a dichos antibióticos, tras diez años de permanencia en condiciones de laboratorio. Es lógico pensar que la sensibilidad ante los β -lactámidos se puede deber a la pérdida de un plásmido.

Las cepas en las que hemos especificado su obtención en el Medio D4 han sido objeto de especial atención en sus reacciones en los diferentes medios, por si el hecho de que crecieran en este medio pudiera estar ligado a otras características fenotípicas particulares.

Finalmente, en el siguiente cuadro vamos a ver las características fenotípicas en las que hemos encontrado variabilidad. Las pruebas comprendidas en este cuadro son:

- ESC: hidrólisis de la esculina.
- GEL: hidrólisis de la gelatina.
- ARA, CAP y CIT: asimilación de arabinosa, caprato y citrato, respectivamente, según el método API 20 NE.
- SU, MN, TR, SO y MA: oxidación de sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol y manosa, respectivamente, en el Medio CF de Hugh y Leifson con discos de hidratos de carbono.

Notas al cuadro:

- En las cepas de *Pseudomonas* procedentes de olivo y acebuche, cuando ARA, CAP y CIT dan reacción positiva, lo hacen a las 72 horas, a excepción de IF 3026 que da positivo a las 48 horas.

- En la prueba de la esculina, cuando ponemos +-, en todos los casos salvo en las cepas que proceden de fresno, es porque el color marrón de la reacción es siempre muy claro.

Cepas de <i>P. syringae</i>	Obtenidas a partir de	Medio	Procedencia	Hidrólisis de		Asimilación de fuentes de carbono										Antibióticos	
				ESC	GEL	ARA	CAP	CIT	SU	MN	TR	SO	MA	SD	SXT		
P81	Tumor de olivo		Baña de la Mascara	++	-	+	-	-	+	-	-	-	-	S	S		
P82	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
P83	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
01	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
02	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
03	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
04	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
05	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
06	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
07	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
08	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
09	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
10	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
11	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
12	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	R	R		
13	"	D4	"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
14	"	D4	"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
15	"	D4	"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
16	Retunado tumor		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
17	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
18	Epífita olivo		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
19	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
20	Dacus oleae		Benidorm	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
19 3026	Tumor de olivo		Rio Cedena	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
P84	Tumor acabuche		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
21	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
22	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
23	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
24	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
25	Tumor de olivo		Villaviciosa O.	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
26	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
27	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
28	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
29	"	D4	"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
30	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
31	"		Montrida	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
32	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
33	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
34	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
35	"		Monteprincipe	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
36	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
37	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
38	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
39	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
40	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
P8A	Tumor de adelfa		Arturo Soria	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
41	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
42	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
43	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
44	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
45	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
46	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
47	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
48	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
49	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
50	"		Campamento	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	R	R		
51	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	R	R		
52	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	R	R		
53	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	R	R		
54	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	R	R		
55	"		Monteprincipe	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
56	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
57	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
58	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
59	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
60	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
61	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
62	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
63	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
64	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
65	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
P8R	Tumor retama		Rio Cedena	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
66	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
67	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
68	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
69	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
70	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
71	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
72	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
73	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
74	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
75	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
76	"		Monteprincipe	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
77	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
78	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
79	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
80	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
81	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
82	"	D4	Boadilla Monte	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	S		
83	"	D4	"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
P8P	Tumor de Fresno		Rio Cedena	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
84	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
85	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
86	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
87	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
88	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
89	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
90	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
91	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		
92	"		"	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	S	R		

1.4. Análisis de la variabilidad de otras bacterias presentes en la flora tumoral.

Según decíamos en IV.1.1., junto con *P. syringae* pv. *savastanoi*, aparecen, en la mayor parte de los casos unas bacterias pigmentadas de amarillo, las predominantes, o apigmentadas, que venimos denominando *Enterobacteriaceae*.

Las cepas amarillas procedentes de *Olea europaea* no solo de tumores, sino también las obtenidas como epifitas y las asociadas a los diferentes estadios de *Dacus oleae*, fueron investigadas en sus caracteres generales y sometidos a pruebas de identificación para *Enterobacteriaceae*, dando los siguientes resultados:

- En Agar Hierro de Kligler daban fermentación de glucosa sin producción de gas, no fermentación de lactosa y no producción de sulfhídrico.
- Urea e Indol, negativos.
- Motilidad, Citrato y Fenilalanina, positivos.
- Lisina y Ornitina descarboxilasa, negativos.
- En el Medio MR-VP, producían acetoina (VP+) y no producían ácidos (MR-).
- No fermentaban dulcitol.
- Reducían nitratos a nitritos.
- Producían hidrólisis de la gelatina al cabo de varios días
- Eran inhibidas por KCN.
- No hidrolizaban el almidón y producían cápsula de levano.
- En cuanto a fuentes de carbono, tenían en común la fermentación de: glucosa, salicina, arabinosa, xilosa,

ramnosa, maltosa, galactosa, glicerol, sacarosa y dextrina.

- No asimilaban ninguna de las siguientes fuentes de carbono: lactosa, dulcitol, adonitol, sorbitol, inulina, rafinosa, trehalosa, inositol, lactato y almidón.

- Sólo encontramos variabilidad en la asimilación de manitol, manosa y fructosa.

Todas las cepas investigadas aquí dieron positiva la aglutinación con suero Anti-Ea.

En cuanto a las cepas no pigmentadas, investigamos varias con la misma procedencia que las anteriores (tumores, epifitas y de *Dacus oleae*), que daban reacción de aglutinación positiva con suero Anti-Eb. Nos encontramos una gran cantidad de características en común con las anteriores, en concreto:

- Daban los mismos resultados en Agar Hierro de Kligler, así como en las pruebas de Urea, Citrato, Indol, Motilidad, Lisina, Ornitina, Dulcitol. Inhibición por KCN, Hidrólisis del almidón y producción de Levano (aunque menos).

- Tenían en común la asimilación de glucosa, salicina, arabinosa, xilosa, glicerol, sacarosa y dextrina, y la no asimilación de lactosa, dulcitol, adonitol, sorbitol, inulina y rafinosa.

Las diferencias con respecto a las cepas pigmentadas eran las pruebas de la Fenilalanina (estas la daban negativa), el Medio MR-VP (estas eran MR+ y VP-), y que no reducían nitratos y no hidrolizaban la gelatina.

En asimilación de fuentes de carbono se diferenciaban

en que estas, al contrario que las cepas pigmentadas, asimilaban trehalosa e inositol, y no asimilaban ramnosa. Además, las cepas no pigmentadas tenían una mayor uniformidad en la asimilación de manitol, manosa y fructosa, dando todas positivo, presentando únicamente diferencias en cuanto a la asimilación de maltosa.

Cuando nos encontramos la misma situación de existencia de *Enterobacteriaceae* pigmentadas de amarillo en *Nerium oleander* y *Retama sphaerocarpa*, aplicamos para estas bacterias las mismas pruebas de identificación, para compararlas con las cepas amarillas de *Olea europaea*.

Además de dar reacción de aglutinación positiva con suero Anti-Ea nos encontramos las siguientes características en común:

- Los mismos resultados en Agar Hierro de Kligler, Urea, Indol, Motilidad, Fenilalanina, Lisina, Ornitina, Nitrato, Gelatina, KCN, Hidrólisis del almidón y Producción de Levano.

- La asimilación de glucosa, salicina, arabinosa, xilosa, maltosa y galactosa, y la no asimilación de lactosa, adonitol, sorbitol, rafinosa, e inositol.

Las cepas de olivo, adelfa y retama se diferenciaban en:

- La acción en el Medio MR-VP, ya que las cepas procedentes de adelfa y retama no producían acetoina.

- La asimilación de algunas fuentes de carbono, presentando cierta variabilidad en los casos del citrato, dulcitol, manitol, trehalosa, manosa, fructosa y ramnosa.

Como en el caso de *Pseudomonas* hicimos un estudio de la

variabilidad de 100 cepas procedentes de las diferentes localizaciones geográficas en las que hemos trabajado, distintas en cuanto a las plantas sobre las que se han encontrado en tumores o como epifitas, y algunas procedentes de *Dacus oleae*. Entre las bacterias estudiadas vamos a incluir las cuatro cepas de colección definidas en Materiales y Métodos, para establecer las oportunas comparaciones:

- *Erwinia carotovora* var. *carotovora*.
- *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*.
- *Agrobacterium tumefaciens* C-58.
- *Agrobacterium tumefaciens* G-88.
- *Agrobacterium tumefaciens* V.

Como en el caso de *Pseudomonas* vamos a describir, en primer lugar, las pruebas que tienen en común las 100 cepas estudiadas para poderlas suprimir del cuadro de variabilidad y evitar así la complejidad innecesaria.

- Todas las bacterias investigadas han dado positiva la prueba ONPG (β -Galactosidasa).

- Todas han dado negativas las siguientes pruebas: Arginina, dihidrolasa, Lisina y Ornitina descarboxilasa, Sulfhídrico, Indol y Oxidasa.

- Todas han dado una reacción intermedia (color marrón claro) en la prueba TDA (Tryptófano desaminasa).

En el siguiente cuadro podemos ver las pruebas sometidas a variación. En él hemos añadido la pigmentación amarilla (P.A.) y la aglutinación con sueros Anti-Ea y Anti-Eb a las pruebas bioquímicas y de asimilación.

Las aclaraciones complementarias a dicho cuadro son:

- Cuando ponemos r.c. en las reacciones de aglutinación, significa reacción cruzada, es decir, una aglutinación más tardía y menos notable que cuando es claramente positiva. (Figura 46)

- En la hidrólisis de la gelatina, vemos que hay una abundancia de reacciones negativas (-) y débiles (++) en las cepas pigmentadas, mientras que anteriormente habíamos dado como carácter general el hecho de que fueran positivas. En este caso, nos debemos fiar más de las pruebas hechas fuera del método API 20 E, con las que se incuba durante varios días, mientras que en el API 20 E, una vez realizadas las reacciones adicionales (a. sulfanílico, α -naftilamina, Reactivo de Ehrlich-Kovacs, etc.) no se puede volver a reincubar, porque los vapores que se

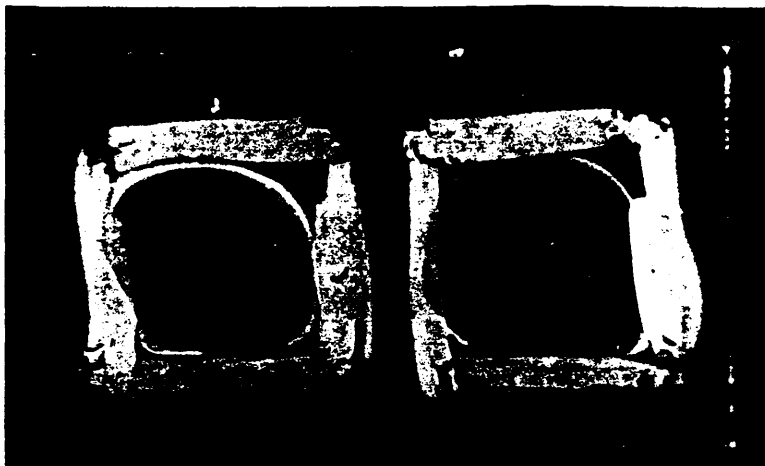


Figura 46. Reacciones de aglutinación con suero Anti-Ea:
Reacción positiva y reacción cruzada.

desprenden en una atmósfera tan limitada interfieren las reacciones normales. Por ejemplo, una vez que se han hecho las reacciones, si se reincuba aunque sólo sea unas horas, todos los indicadores de la fermentación de hidratos de carbono viran a ácido, como si fueran positivos.

En el caso de la mayoría de las cepas procedentes de *Fraxinus excelsior*, cuando ponemos ++, hay que destacar que la hidrólisis de la gelatina es notable a las 24-48 horas. (Figura 47)

- En las pruebas de fermentación de hidratos de carbono, el compartimento del inositol, que aparece como negativo en todas las cepas pigmentadas puede inducirnos a error, por ser desde un primer momento de un tono verde-amarillento. La comprobación de

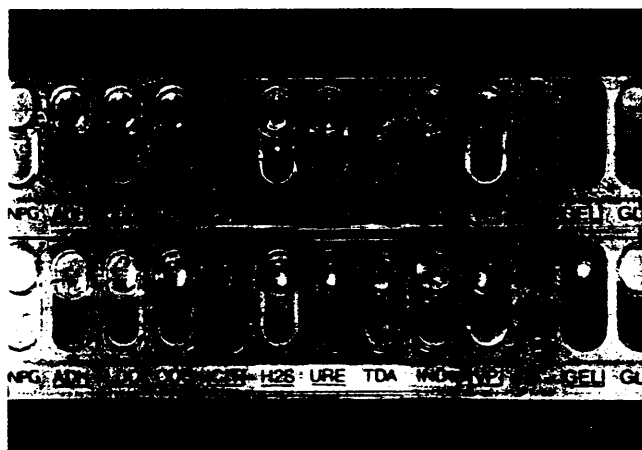


Figura 47. Pruebas de identificación API 20 E de cepas de *Enterobacteriaceae* procedentes de *Fraxinus excelsior*, en las que destaca su clara reacción positiva de hidrólisis de la gelatina.

que efectivamente es negativo la hemos hecho basándonos en el Agar Base Rojo Fenol adicionado con un disco de inositol.

- En la reducción de los nitratos, en la que sale positiva la producción de nitritos y no, salvo en un caso, la producción de nitrógeno, es probable que algún caso que hemos dado como negativo, sea positivo, porque puede ocurrir que la reducción sea total, hasta nitrógeno y tan rápida que no lleguemos a detectarla.

- Las dos variedades (subespecies, según el "Bergey's Manual") de *Erwinia carotovora*, salvo en el apartado de pigmento amarillo y en la reacción de aglutinación, que dan reacción cruzada, producen exactamente las mismas modificaciones en los medios de cultivo que la mayoría de las cepas amarillas.

- Por el contrario, las tres cepas investigadas de *Agrobacterium tumefaciens*, vemos que no tienen, practicamente, ninguna relación. Mientras que las 97 bacterias restantes son todas fermentadoras, vemos que estas tres cepas no.

2. PRESENCIA DE LA FLORA BACTERIANA ASOCIADA A LOS TUMORES EN LOS PARASITOS DEL OLIVO.

Los parásitos detectados sobre *Olea europaea* en la comarca de Navahermosa fueron:

- *Saissetia oleae*, acompañada siempre del habitual *Capnodium oleophilum* (Figura 48). Ambos parásitos son compartidos por otra planta afectada de tuberculosis, *Nerium oleander*. Los ataques más fuertes debido a estos dos organismos, los hemos observado en olivares (o jardines, en el caso de *Nerium*



Figura 48. *Saissetia oleae* en el envés de las hojas del olivo, acompañada de un fuerte ataque de *Capnodium eleaophilum*.

oleander) que han sido ampliamente tratados con insecticidas, a los que es resistente *Saissetia oleae* debido a su fuerte cutícula que le protege. Los insecticidas deben terminar con los enemigos biológicos naturales de la cochinilla, favoreciendo su proliferación. Ruiz Castro (1951) cita varias decenas de enemigos de este organismo, aunque reconoce que sólo habían descrito cuatro en España. Nosotros hemos detectado, en la zona de Villaviciosa de Odón (Madrid), cochinillas que habían sido destruidas por alguna larva de insecto no identificada, con un orificio de salida a través de la cutícula. En la Raña de la Mascara hemos descubierto varios enemigos naturales de *Saissetia oleae*, no descritos en la bibliografía; se trata de diferentes especies de hormigas que son capaces de detectar y eliminar

todas y cada una de las cochinillas presentes en cada árbol (Figura 49).

En cuanto al gran decaimiento que se produce en los árboles como consecuencia del ataque combinado de *Saissetia oleae* y *Capnodium eleaophilum* todos los autores señalan que debe ser consecuencia de la interrupción de la fotosíntesis al cubrirse la superficie con el hongo. La explicación nos parece bastante simple a la vista de nuestras observaciones. En primer lugar hay que destacar que la superficie cubierta por el hongo es, principalmente, el envés de la hoja (Figura 48). En segundo lugar, tras el fuerte ataque, se desencadena una clorosis en el haz que no es explicable por la interrupción de la fotosíntesis (Figura 50). Teniendo en cuenta la capacidad toxigénica de los hongos, creemos que la producción de alguna toxina podría ser la



Figura 49. *Camponotus cruentatus* (izquierda) y *Crematogaster auberti* (derecha) atacando a *Saissetia oleae*.

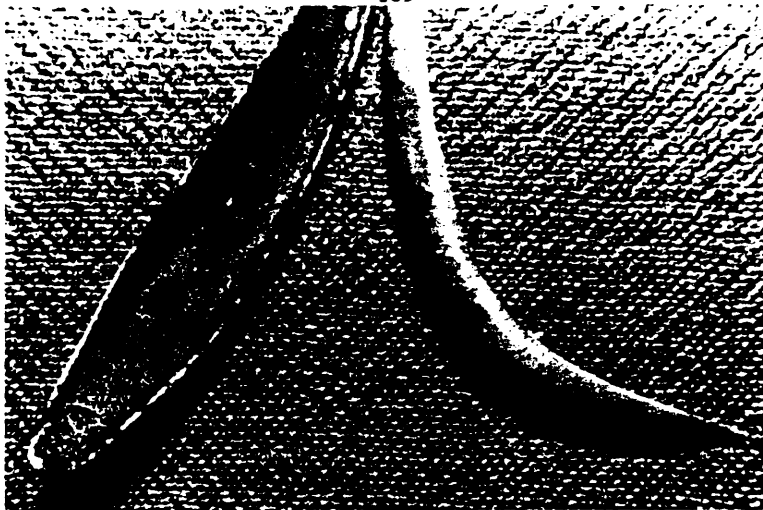


Figura 50. Clorosis desencadenada en el haz de las hojas de olivo, como consecuencia del ataque por el envés de *Capnodium eleaophilum*.

explicación de los daños ocasionados en la planta. Naturalmente se trata sólo de una hipótesis que se podría investigar y que se sale de los objetivos de este trabajo.

- *Prays oleae*, encontrada con carácter muy ocasional y nunca determinando ataques importantes sobre los olivares de la Raña de la Mascara (Figura 51).

- *Euphyllura olivina*, detectada con cierta frecuencia sobre los brotes de primavera a los que da su típico aspecto algodonoso (Figura 52). Este parásito a pesar de su frecuencia, no hemos encontrado que produzca daños graves en el olivar puesto, de acuerdo con Arambourg (1975) pertenece al grupo de importancia económica media o localizada.

- *Phloeotribus scarabeoides* (Figura 53), aunque



Figura 51. Las tres generaciones de *Prays oleae*. En las flores: generación antófaga. En el fruto: generación carpófaga. En las hojas: generación filófaga.

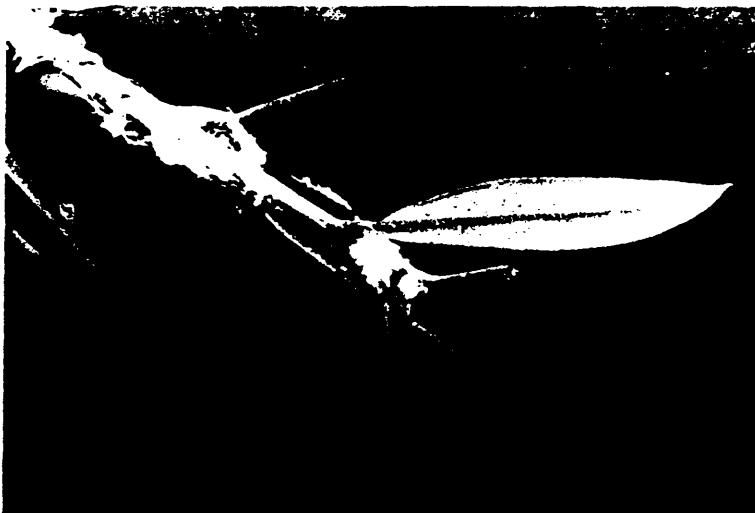


Figura 52. Brotes de olivo atacados por *Euphyllura olivina*.

perteneciente también, junto con el anterior, al grupo de importancia media o localizada, hemos observado que en la zona estudiada ha producido importantes daños ocasionales, como consecuencia del abandono, sin quemar o retirar, de los restos de las podas. A este parásito nos lo hemos podido encontrar en algunas ocasiones en perforaciones practicadas por él en los tubérculos inducidos por *P. syringae* pv. *savastanoi*.

- *Dacus oleae*, el único de estos parásitos que hemos encontrado, en base a la literatura y a nuestras propias observaciones, que tiene relación con la tuberculosis del olivo. Ampliamente extendido por la Raña de la Maseura, donde presenta varias generaciones anuales. Según describimos en Materiales y Métodos, a partir de los tres estadios del parásito hemos podido aislar y visualizar a *P. syringae* pv. *savastanoi* así como a las *Enterobacteriaceae* tumorales.



Figura 53. *Phloeotribus scarabeoides* en ramas abandonadas procedentes de la poda del olivo.

2.1. Obtención de cultivos.

Los cultivos eran obtenidos a partir de las fuentes ya descritas:

- A partir del insecto adulto, anestesiado y puesto en placas con los medios de aislamiento, obteníamos la "siembra" de las bacterias que portaba (Figura 54).

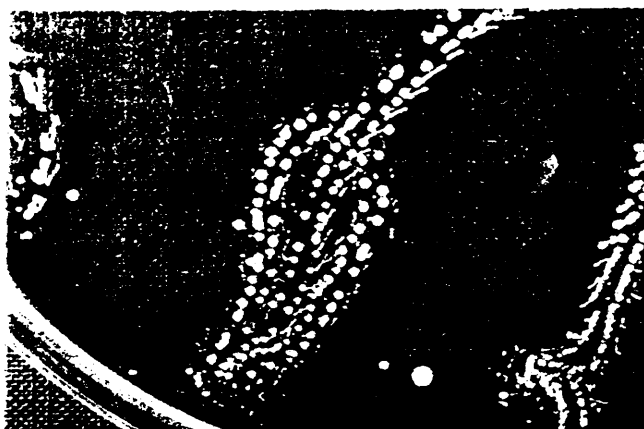


Figura 54. "Siembra" realizada por *Dacus oleae* sobre Medio B de King.

Las bacterias obtenidas, resembradas en cultivo puro a partir de colonias aisladas, fueron identificadas en base a sus características bioquímicas y a las reacciones de aglutinación como *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* y las dos cepas de *Enterobacteriaceae* más características de la flora tumoral, las pigmentadas de amarillo y las apigmentadas.

De las tres bacterias aisladas, las *Enterobacteriaceae*

amarillas eran las predominantes, apareciendo sólo en algunos de los cultivos.

- A partir de las glándulas salivales de las larvas sembrando en los medios de aislamiento, conseguimos similares resultados que en el caso anterior.

- A partir de las pupas, puestas en condiciones de esterilidad en las placas, se producía la salida del insecto adulto, dando los mismos resultados que en primer caso.

2.2. Observaciones microscópicas.

Las observaciones microscópicas de la presencia de *P. syringae* pv. *savastanoi* en el interior de *Dacus oleae* se hicieron empleando los anticuerpos Anti-Ps1 marcados con fluoresceína.

Las glándulas salivales de las larvas eran sometidas a aplastamiento entre porta y cubre y teñidas con los anticuerpos fluorescentes. Las imágenes obtenidas quedan reflejadas en la Figura 55.



Figura 55. Bacterias, marcadas con anticuerpos fluorescentes, procedentes de glándulas salivales de larvas de *Dacus oleae*.

Las pupas, cortadas con microtomo de congelación, también eran teñidas con anticuerpos fluorescentes, observándose la aparición de bacterias fluorescentes.

3. POSIBLE TRANSMISION DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO EN LA RECOLECCION.

3.1. Obtención de cultivos y observaciones microscópicas.

Según los métodos descritos en III.2.6., tomamos muestras a partir de gotas de rocío en las hojas durante la recolección y muestras de las varas antes y después de iniciarse la recolección. Los cultivos obtenidos a partir de gotas de rocío resultaron todos positivos, hasta el punto de qué, en algunos casos, conseguimos prácticamente, el mismo resultado que si se tratase de una siembra típica de tumor, es decir un cultivo mixto de *P. syringae* pv. *savastanoi* y sus *Enterobacteriaceae* habituales (Figura 56).

Los cultivos realizados a partir de las varas que no habían iniciado la recolección resultaron todos negativos en cuanto a la flora buscada, aunque, por supuesto, presentaban una flora mixta.

Los cultivos procedentes de varas en recolección resultaron la mayoría de ellos positivos, conteniendo tanto *P. syringae* pv. *savastanoi* como las *Enterobacteriaceae* acompañantes. Además varias de las muestras suspendidas en tampón PBS, que fueron teñidas con anticuerpos fluorescentes, resultaron positivas, como vemos en la Figura 57.

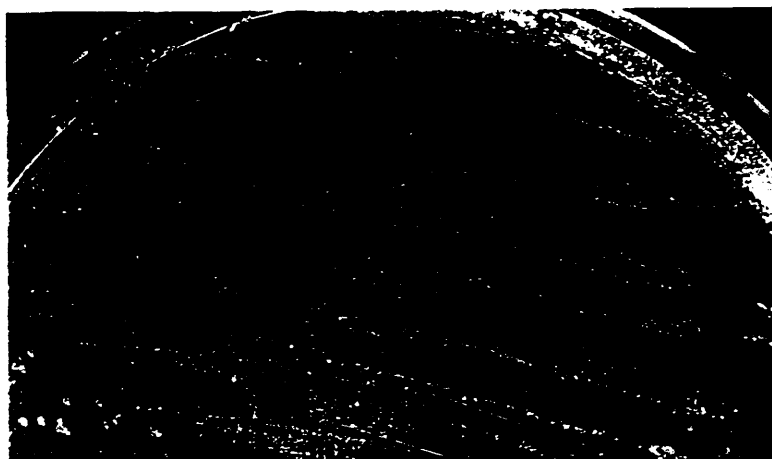


Figura 56. Siembra realizada a partir de gotas de rocío presentes en el olivo despositadas sobre placas de Agar Nutritivo. En ellas se observan *P. syringae* pv. *savastanaoi*, *Enterobacteriaceae* amarillas y mohos.



Figura 57. Tinción con anticuerpos fluorescentes de una muestra procedente de las varas empleadas en la recolección.

3.2. Observaciones de campo

Comparando la situación de la enfermedad que se encuentra en olivares cultivados y olivares no cultivados, hemos podido constatar claramente que el cultivo favorece el desarrollo y extensión de la tuberculosis del olivo.

En los olivares no cultivados, los tumores aparecen secos en su gran mayoría y raramente se encuentran tumores recientes en desarrollo. La epidermis de las ramas se encuentra más lignificada y es frecuente encontrar sobre ella líquenes que contribuyen a su deterioro (Figura 58).



Figura 58. Aspecto típico de las ramas de un olivo procedente de un olivar no cultivado.

Por el contrario, en los olivares cultivados, el normal arado, poda, abonado y estercolado, hace que las plantas tengan un crecimiento muy activo, afectando dicho crecimiento y

vigor, no sólo a los tejidos normales, sino también a los tejidos patológicos. Si a esto añadimos los daños e "inoculación" que se puede llegar a producir con el vareo, nos encontraremos la realidad de la afirmación con que iniciabamos este apartado.

4. VARIACIONES ESTACIONALES DE LA FLORA EPIFITICA DEL OLIVO.

4.1. Recuento de los microorganismos totales.

Los recuentos de los microorganismos totales hechos a lo largo de los cuatro últimos años en la Raña de la Mascara nos han dado los resultados que se esquematizan en las Figuras 59, 60, 61, 62, 63 y 64.

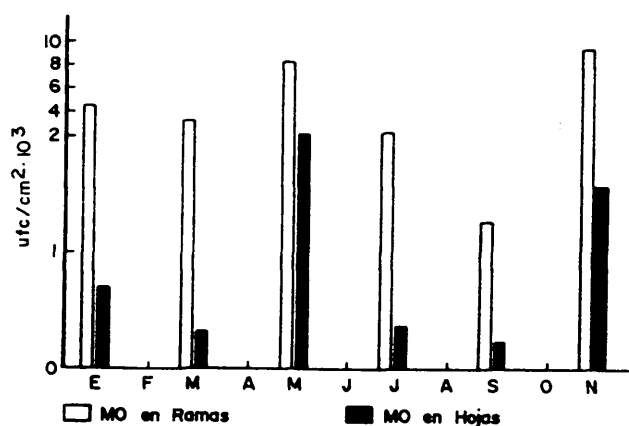


Figura 59. Recuento de la flora epifítica de la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1985.

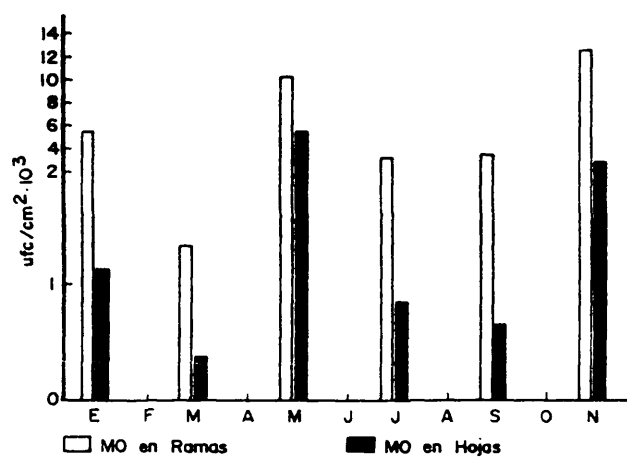


Figura 60. Recuento de la flora epifítica de la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1986.

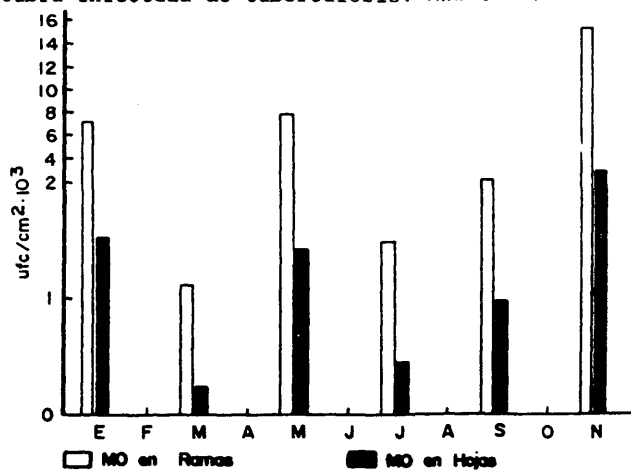


Figura 61. Recuento de la flora epifítica de la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1987.

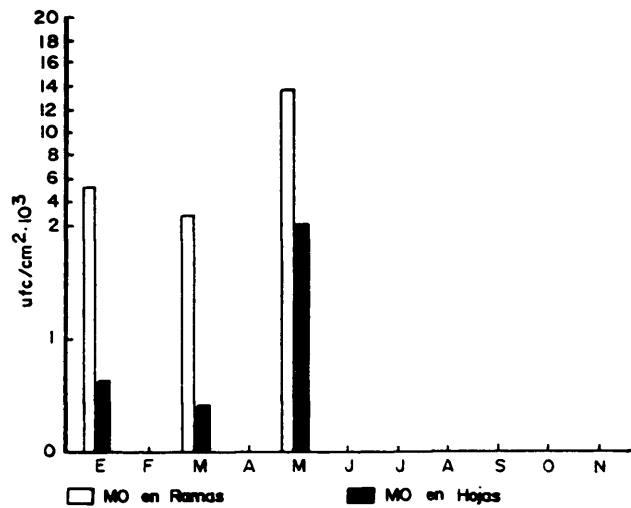


Figura 62. Recuento de la flora epifítica de la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1988.

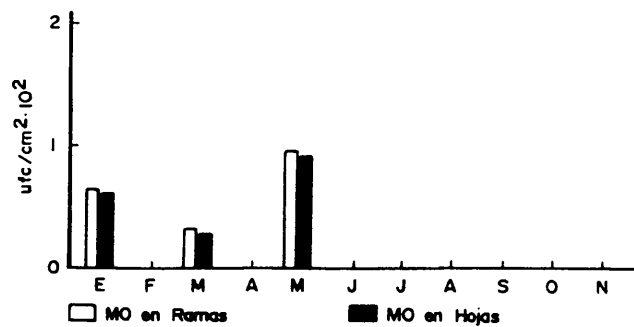


Figura 63. Recuento de la flora epifítica de la variedad Cornicabra sana. Año 1988.

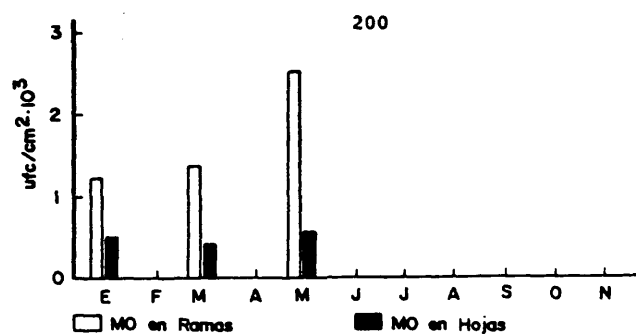


Figura 64. Recuento de la flora epifítica de la variedad Manzanilla. Año 1988.

4.2. Recuento de *P. syringae*.

Los recuentos de *P. syringae* presente como epifita sobre los olivos de la Raña de la Mascara se esquematizan en las Figuras 65, 66, 67, 68, 69 y 70.

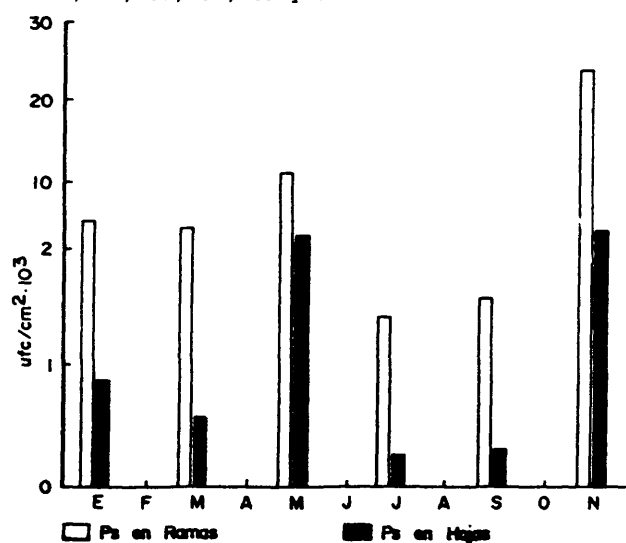


Figura 65. Recuento de *P. syringae* sobre la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1985.

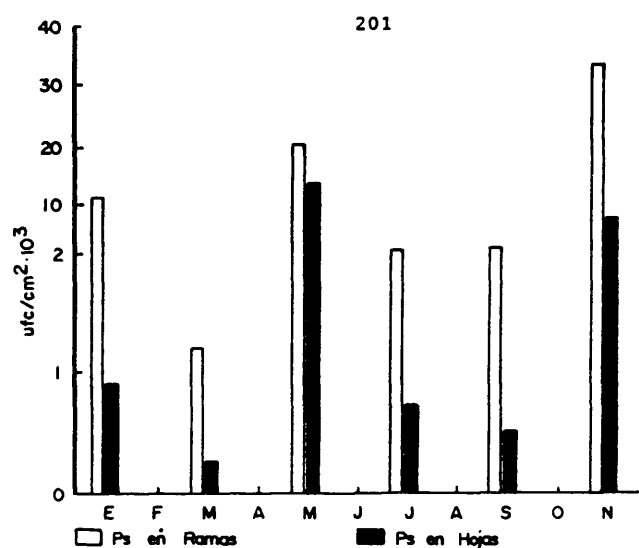


Figura 66. Recuento de *P. syringae* sobre la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1986.

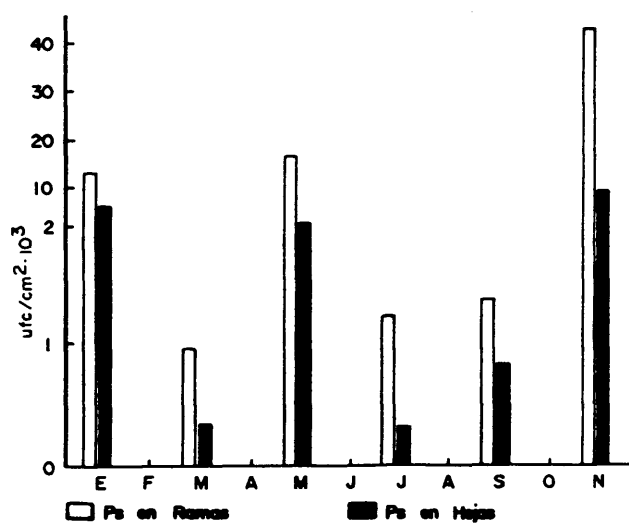


Figura 67. Recuento de *P. syringae* sobre la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1987.

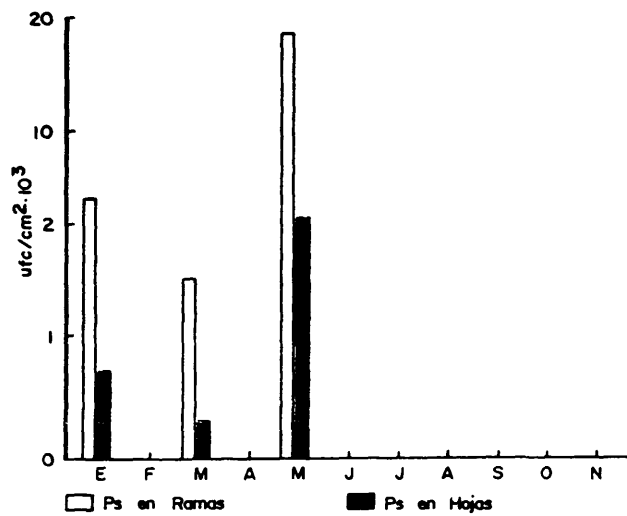


Figura 68. Recuento de *P. syringae* sobre la variedad Cornicabra infectada de tuberculosis. Año 1988.

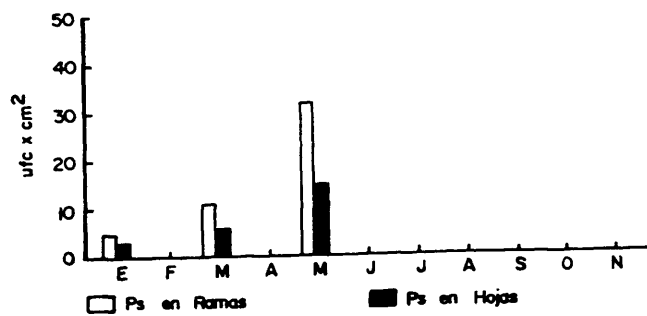


Figura 69. Recuento de *P. syringae* sobre la variedad Cornicabra sana. Año 1988.

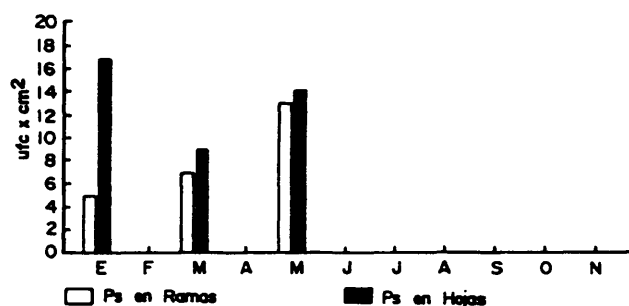


Figura 70. Recuento *P. syringae* sobre la variedad Manzanilla. Año 1988.

5. ANATOMIA, HISTOLOGIA Y CITOLOGIA DE LOS TUMORES INDUCIDOS ESPONTANEA O EXPERIMENTALMENTE POR *P. SYRINGAE* PV. SAVASTANOI.

5.1. Observaciones a nivel macroscópico.

En las plantas afectadas naturalmente de tuberculosis (*Olea europaea*, *Nerium oleander*, *Fraxinus excelsior* y *Retama sphaerocarpa*), el ataque principal se produce en las ramas jóvenes. En todos los casos, en las primeras etapas del desarrollo del tumor, este es del mismo color que la rama afectada, aunque de tacto más blando y esponjoso. En la Figura 71 vemos que los dos tumores de olivo de la derecha están en sus primeros estadios, al igual que sucede en la Figura 72 con los tumores de retama.

En corte, a nivel macroscópico, en todas las plantas afectadas nos encontramos situaciones similares: la masa tumoral se encuentra rodeando a auténticos canales y colonias bacterianas (Figura 73).



Figura 71. Tumores en *Olea europaea*. Los dos de la derecha son recientes y el de la izquierda está comenzando a lignificarse.



Figura 72. Tumores inducidos en *Retama sphaerocarpa* por *P. syringae* pv. *savastanoi*.



Figura 73. Tumores de *Olea europaea* (arriba) y *Retama sphaerocarpa* (abajo), en los que se observa la localización de las bacterias.

En estas figuras vemos como las localizaciones en las que se encuentran las bacterias tienen un aspecto jabonoso y que hay zonas en las que el canal de infección se encuentra comunicado con el exterior. Según nuestras observaciones, esta comunicación con el exterior se establece cuando la proliferación de las bacterias es extraordinaria, comparable a la que se puede obtener en el laboratorio en condiciones ideales de incubación. Esto ocurre en dos ocasiones al año: durante las tardías lluvias primaverales y con las primeras lluvias otoñales. En ambos casos, al día siguiente de desencadenarse las precipitaciones, puede verse como en la superficie de los tumores frescos comienzan a aparecer auténticas colonias bacterianas, similares a las que se forman en un medio de cultivo sólido (Figura 74). A partir de estas



Figura 74. Formación de colonias bacterianas en la superficie del tumor al aumentar la humedad relativa del aire.

colonias se podía sembrar en los medios de cultivo habituales y obtener las bacterias asociadas a los tumores y tanto *P. syringae* pv. *savastanoi* como las Enterobacteriaceae blancas y amarillas. Este fenómeno, si duran las lluvias, se mantiene durante unos dos días, terminando cuando las bacterias son completamente lavadas y arrastradas por las precipitaciones. También hemos podido observar que no es absolutamente necesaria la lluvia para que se desencadenen estos hechos, porque algunos años las precipitaciones otoñales se retrasan, siendo precedidas por intensas nieblas. En estas condiciones de abundante humedad atmosférica y temperaturas favorables, ocurre también la aparición de colonias bacterianas, aunque de forma menos generalizada que en el caso de lluvias.

A medida que evolucionan los tumores, estos se van lignificando, oscureciéndose el color hasta llegar a hacerse negro, del mismo tono que la corteza del tronco o las ramas viejas (Figura 71, tumor de la izquierda). Simultáneamente, el contenido bacteriano va disminuyendo hasta llegar a encontrarnos tumores completamente lignificados y estériles. Las ramas afectadas por estos tumores pierden vigor o pueden secarse completamente.

Las hojas, en el olivo, suelen verse más raramente afectadas, y cuando esto ocurre, los tumores son de menor desarrollo pero con las mismas características morfológicas que los que se dan en las ramas (Figura 75). Por el contrario en adelfa, las hojas resultan afectadas por la enfermedad con idéntica frecuencia que las ramas. Las formaciones tumorales

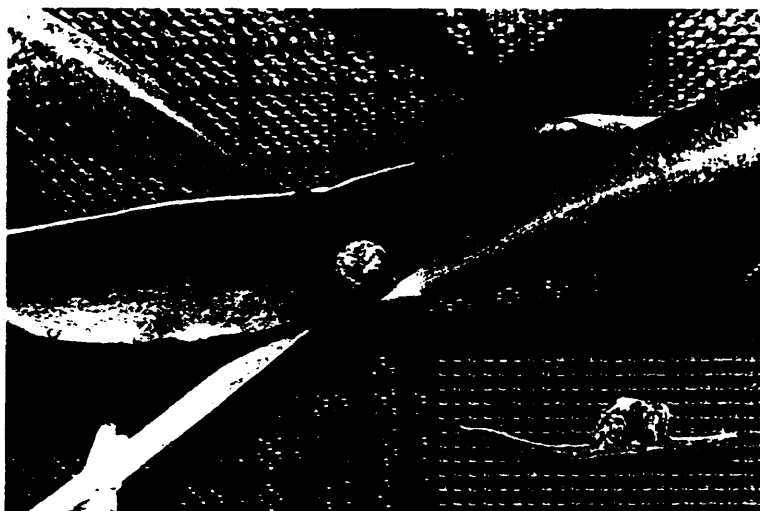


Figura 75. Tumores en hojas de olivo. Abajo, en corte.

que adquieren más desarrollo en las hojas de adelfa son las que afectan al nervio central (Figura 76), aunque en el resto de la anatomía de la hoja se produce una mayor abundancia de formaciones hiperplásicas. En fresno nunca hemos encontrado tumores en hojas, siendo los más frecuentes los que se producen en el peciolo al caerse las hojas (Figura 77). Este mismo fenómeno aparece también como más frecuente en retama.

En el fruto nunca hemos encontrado desarrollo, tumores en ninguna de las plantas estudiadas, a pesar de las citas dadas por Pasinetti (1953). Únicamente nos hemos encontrado formaciones hiperplásicas en el pedúnculo de olivo que llegan a impedir el desarrollo del fruto. (Figura 78)



Figura 76. Tumor en el nervio central de hoja de *Nerium oleander*.



Figura 77. Tumores en *Fraxinus excelsior*.

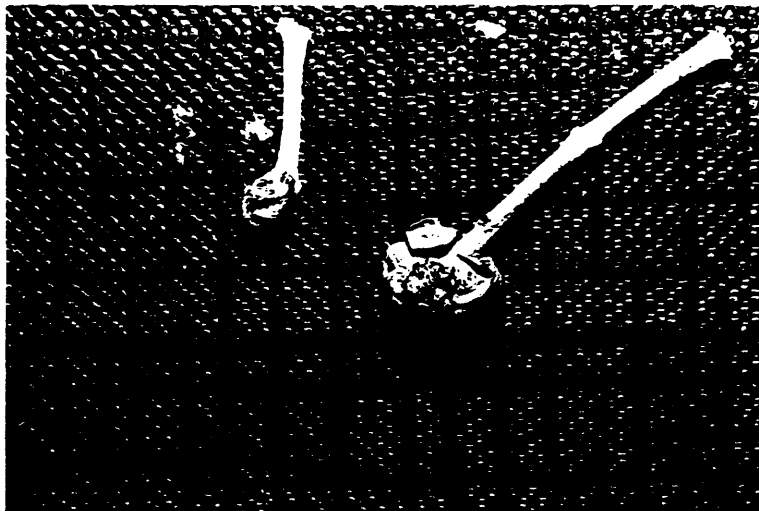


Figura 78. Tumores en el pedúnculo de *Olea europaea*.

Tampoco hemos podido demostrar nunca la aparición de los tuberculos metastásicos descritos por Smith (1908, 1920), ni en los tumores naturales ni en los experimentales de las plantas afectadas. En las inoculaciones experimentales realizadas como pruebas de patogeneidad todos los tumores obtenidos se formaban siempre en el lugar de la inoculación y nunca hemos podido observar la dispersión secundaria de la bacteria. El único caso de dispersión metastásica lo hemos encontrado en *Lycopersicum esculentum*, al ser inoculada artificialmente, ya que no es una planta afectada por la enfermedad en condiciones naturales (Figura 43).

5.2. Observaciones microscópicas.

5.2.1. Histología de tumores de rama de olivo.

En primer lugar hemos estudiado la anatomía normal de la rama de olivo, para poder comparar la situación de estos tejidos con la que aparece en las condiciones patológicas de formación de tubérculos. Hemos comparado, a nivel histológico, las dos variedades de olivo tratadas en este trabajo (Cornicabra y Manzanilla), por si encontrásemos diferencias a nivel de superficie que nos explicasen la distinta sensibilidad ante la enfermedad. No encontramos ninguna diferencia histológica entre las dos variedades.

La histología de una rama normal de olivo consta de los siguientes tejidos, esquematizados en la Figura 79. Del exterior al interior nos encontramos:

- Una capa de súber que substituye a la epidermis.
- El felógeno o cambium suberígeno, meristemo lateral secundario, formado por una o más series de células alargadas en sentido tangencial.
- Un parénquima cortical constituido por dos tipos de células, siendo las más internas de forma ovoide ricas en citoplasma y en cloroplastos.
- Un anillo mecánico de esclerénquima que rodea al cilindro vascular.
- El cilindro vascular, con la estructura típica de floema, hacia el exterior, el cambium, intermedio, y el xilema, hacia el interior.

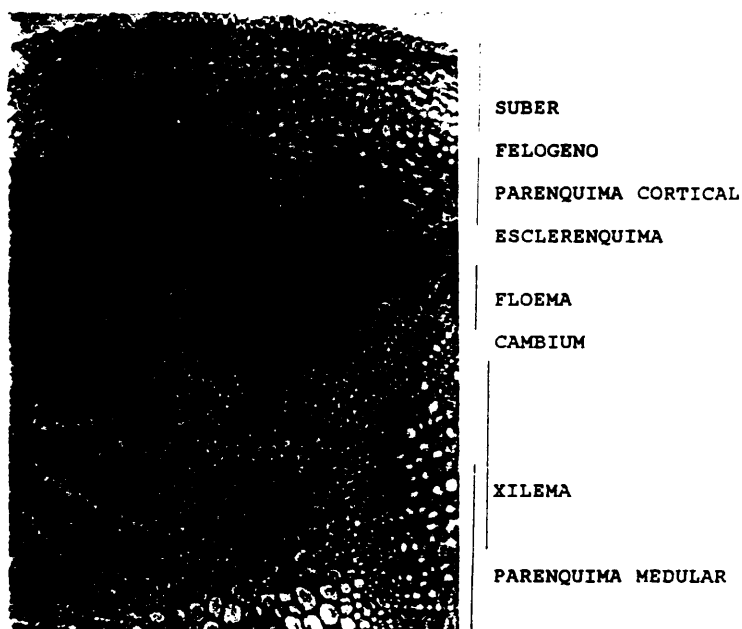


Figura 79. Histología de un tallo de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 100.

- El parénquima medular constituido por células mas grandes cuanto mas hacia el interior, conteniendo granos de almidón y cristales qué, según Metcalfe y Chalk (1972), deben ser de oxalato. La estructura de estas células parenquimáticas es mostrada con más detalle en la Figura 80 para que podamos compararlas con las que constituyen la parte más importante, desde el punto de vista cuantitativo, de la masa tumoral.

Una vez conocida la estructura de la planta sana, pasamos a ver los resultados obtenidos de la observación de tumores naturales.



Figura 80. Estructura de las células del parénquima medular de tallo de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 1000.

En los primeros estadios del desarrollo del tumor la reproducción hiperplásica afecta, sobre todo, a las células parenquimáticas, que constituyen la gran masa. Estas células pueden ser del parénquima medular, cuando la lesión por la que ha penetrado la bacteria es profunda, o del parénquima cortical, cuando la lesión ha sido superficial (Figura 83). Entre esta masa de parénquima aparecen otros tipos celulares desorganizados, como células de esclerénquima (Figura 81) y masas de colénquima lagunar (Figura 82).

El segundo tejido afectado es el súber superficial que aumenta de volumen y da al tumor su típico aspecto de superficie. (Figura 83)



Figura 81. Células pétreas de esclerénquima incluidas entre células parenquimáticas en la masa del tumor. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 1000.

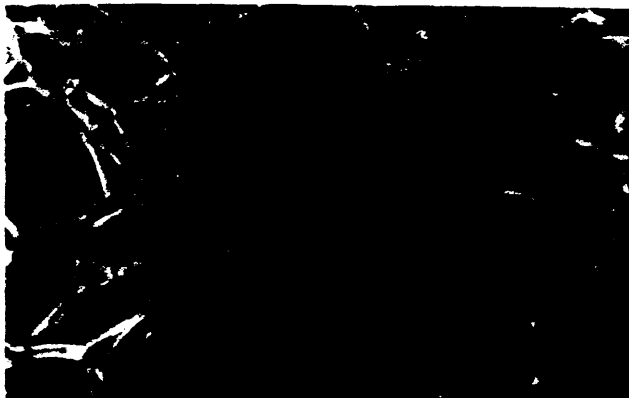


Figura 82. Células de colénquima lagunar pertenecientes a un tumor de rama de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 1000.

Cuando más evolucionado está el tumor aparecen frecuentemente islotes vasculares constituidos por traqueidas punteadas de xilema, dispuestas de forma aproximadamente concéntrica alrededor de un núcleo central y rodeadas de un anillo cambial que produce hacia el exterior un estrato de floema. (Figura 84)

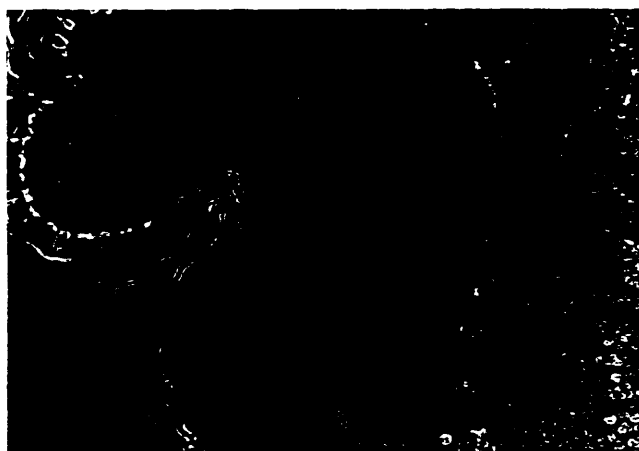


Figura 83. Estructura de un tumor reciente y superficial en una rama de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 100.

Incluido en la masa tumoral y dispuesto de forma irregular se encuentra el canal de infección, rodeado de células necróticas y rotas. Este es el único punto en el que se detecta a las bacterias, siempre con localización extracelular como lo demuestran, tanto las observaciones con microscopía de campo claro, como la inmunofluorescencia. Haciendo preparaciones con microtomo de congelación de la zona correspondiente al canal de



Figura 84. Islotes vasculares formados en el interior de la masa de células parenquimáticas en un tumor de hoja de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 400.



Figura 85. Masa de bacterias del canal de infección teñidas con anticuerpos fluorescentes. X 1000.

infección y tiñendo con anticuerpos Anti-Ps 1 marcados con fluoresceína, las imágenes observadas con microscopio de fluorescencia nos confirman que éste es el único sitio en el que se encuentra el agente etiológico. (Figura 85)

A nivel de microscopía electrónica, hicimos preparaciones para la observación de las características morfológicas de las células que constituyen la gran masa del tumor y, por otro lado, cortes en la zona correspondiente al canal de infección.

En el primer caso nos encontramos estructuras de células típicas sin ninguna anomalía destacable, como las que se observan en la Figura 86. Por un lado células parenquimáticas con granos de almidón y cristales de oxalato, muy parecidas a las del parénquima medular mostradas en la Figura 80, pero con irregularidad morfológica, como se aprecia también en la Figura 81. Por otro lado, masas de colénquima lagunar como las ya descritas a microscopía óptica en la Figura 82, con una gran vacuola central y gruesas paredes celulares.

En el segundo caso, en los cortes obtenidos en la parte del canal de infección, hemos podido volver a confirmar la localización siempre extracelular de las bacterias. En algunas imágenes nos hemos encontrado microorganismos dentro de células, pero siempre se trataba de células rotas que rodean al canal de infección. En las células aún no destruidas se puede ver la degeneración de las paredes celulares, apareciendo estas más finas (Figura 87)



Figura 86. Células pertenecientes a la masa tumoral. Arriba: Célula parenquimática (X 6080). Abajo: Célula de colénquima (X 7267).



Figura 87. Arriba: Bacterias en las paredes del canal de infección (X 6384). Abajo: Bacterias en el interior del canal de infección (X 30.400)

5.2.2. Histología de tumores de hoja de olivo.

La anatomía normal del limbo ya ha sido descrita basicamente en I.1.1.3.3.

La situación patológica se asemeja enormemente a la que acabamos de ver para los tumores de ramas.

La gran masa del tumor está formada por la proliferación del parénquima dentro del cual aparecen elementos conductores desorganizados (Figura 84, 88 y 89). En ésta última podemos ver como sobre el haz vascular de la hoja, con su típica forma de media luna propia de las Oleaceae, aparece una masa de lignificación que ha captado la tinción con floroglucina. Esta masa densa es la que rodea al canal de infección, como veremos que aparece en los cortes obtenidos seriadamente. (Figuras 91 y 92)

Sobre esta masa lignificada aparecen elementos del xilema con disposición radial hacia la superficie.

El parénquima en empalizada que, en condiciones normales, tiene una estructura y dimensiones celulares perfectamente regulares, sufre un alargamiento celular en la zona en que se aproxima al tumor. (Figuras 90 y 91)

Finalmente, el exterior se encuentra recubierto también por una gruesa felodermis.

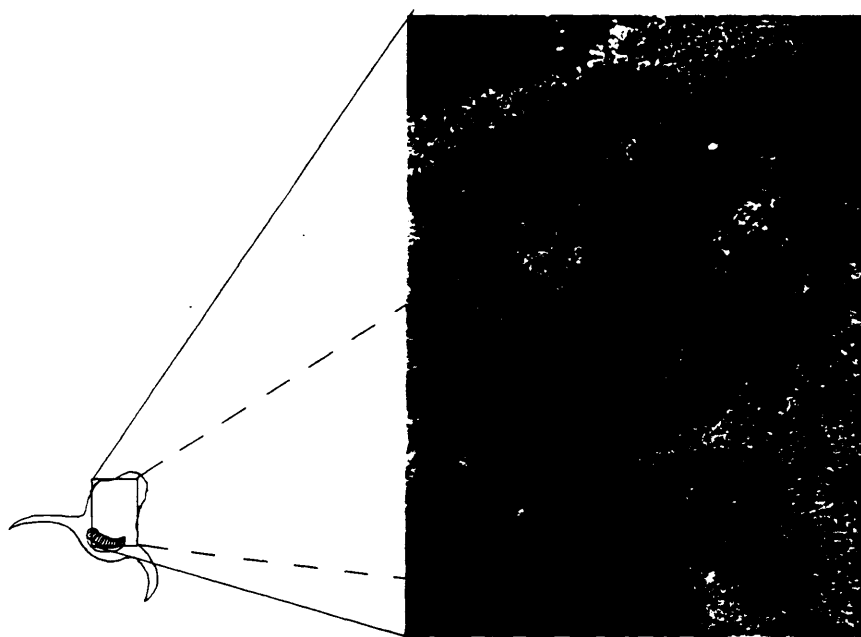


Figura 88. Corte de tumor de hoja de olivo. Tinción: Floroglucina clorhídrica. X 100.

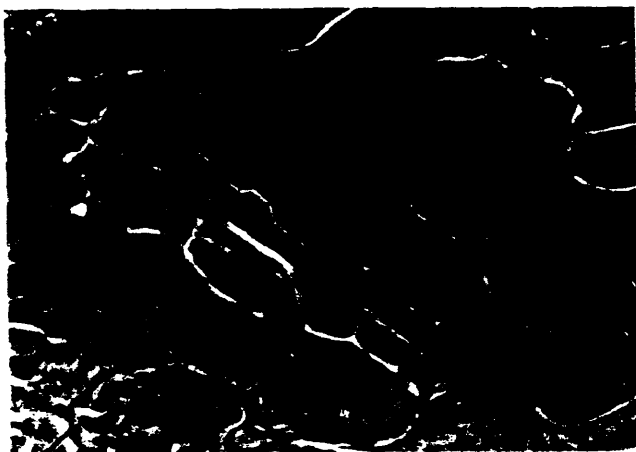


Figura 89. Comienzo de la aparición de elementos conductores en la masa parenquimática de tumor de hoja de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 1000.

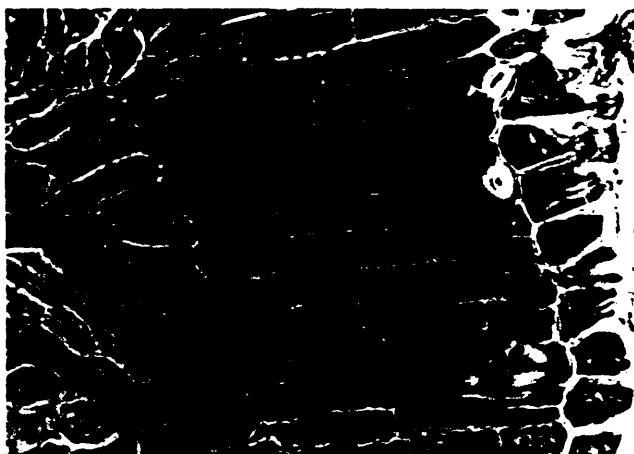


Figura 90. Alargamiento de las células del parénquima en empalizada en un tumor de hoja de olivo. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 400.

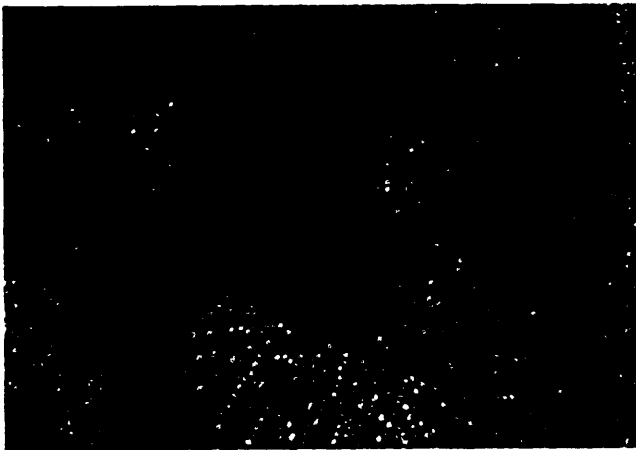


Figura 91. Zona de células destruidas correspondiente al canal de infección. Tinción Safranina-Verde de Metilo. X 100.



Figura 92. La masa central más densa se corresponde con uno de los inicios de un canal de infección. Tinción Safranina-Verde de Metilo. X 100.

5.2.3. Histología de los tumores de *Retama sphaerocarpa*.

En primer lugar describimos la anatomía normal de un tallo sano de retama.

El tallo en corte tiene un perfil con morfología de rueda dentada. Del exterior al interior nos encontramos las siguientes estructuras:

- La epidermis.
- Un parénquima cortical que tiene continuidad con el parénquima medular, debido a la irradiación de este hacia el exterior.
- Masas de esclerénquima en cada uno de los salientes descritos del perfil.
- Los haces vasculares discontinuos con disposición radial.

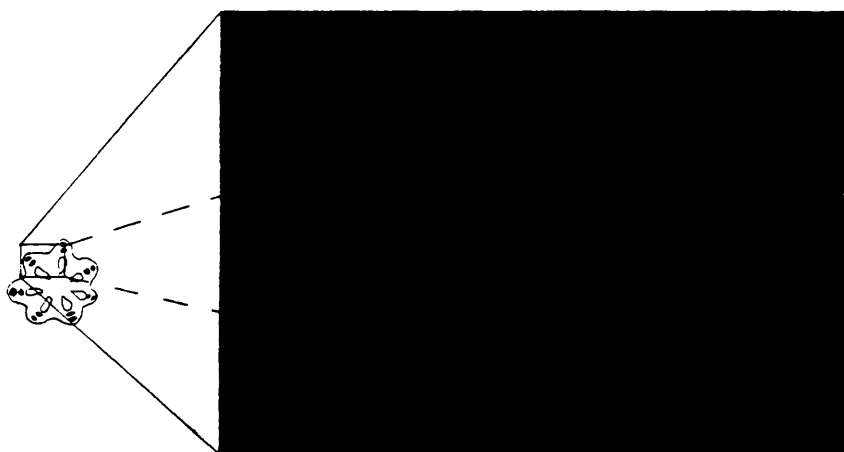


Figura 93. Histología del tallo sano de *Retama sphaerocarpa*
Tinción: Floroglucina clorhídrica. X 100.



Figura 94. Estructura de un tumor en *Retama sphaerocarpa*.
Tinción: Floroglucina clorhídrica. Derecha: Vista general. X 40.
Izquierda: Detalle de la zona encuadrada. X 100.

La histología tumoral en *Retama sphaerocarpa* que vemos resumida en la Figura 94, también es muy similar a los dos casos que acabamos de describir.

Vemos que la gran masa tumoral está constituida por el parénquima, entre el cual nos encontramos elementos conductores desorganizados. (Figuras 94, 95 y 96)

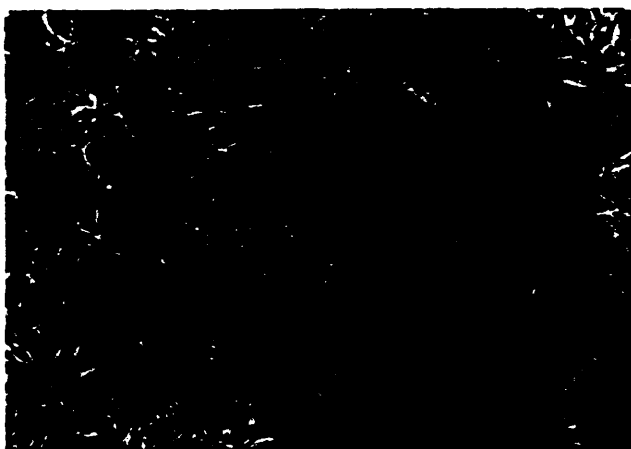


Figura 95. Elementos vasculares incluidos en la masa parenquimática de un tumor de retama. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 400.

También se puede observar la pérdida de la estructura radial ordenada de los elementos conductores, apareciendo estos con una estructura irregular y mas desarrollados hacia la masa tumoral.

Hay que destacar el hecho de que los elementos del xilema desorganizados que se forman entre el parénquima, se encuentran reforzados por esclerénquima y rodeados de un cambium

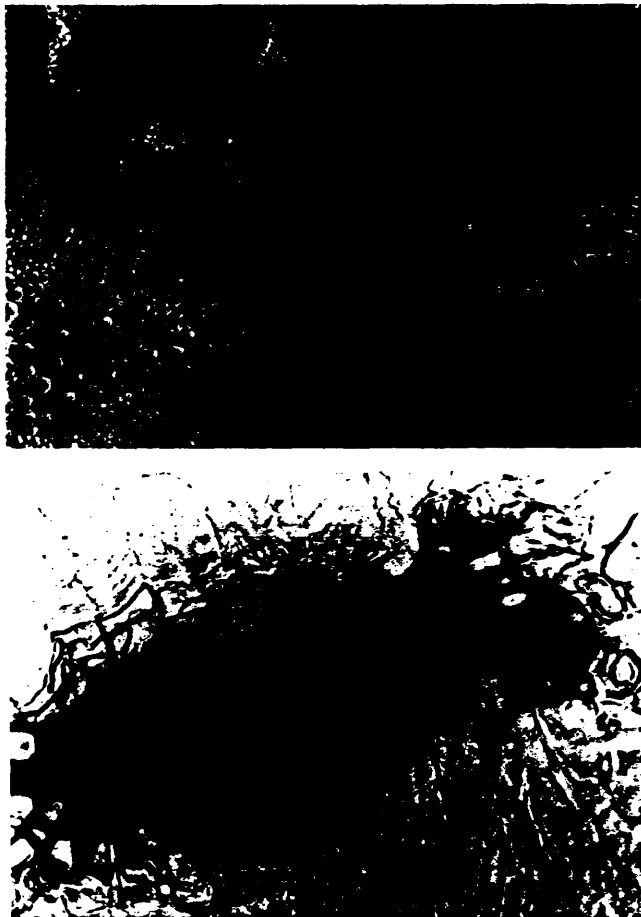


Figura 96. Elementos vasculares en corte transversal, incluidos en el parénquima de tumor de retama. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. Arriba: X 100. Abajo: X 400.

que produce floema hacia el exterior. Esta circunstancia puede ser apreciada en el corte transversal de una de estas estructuras en la Figura 96.

Hacia el exterior, al igual que aparece en los tumores de olivo, se forma una gruesa felodermis. (Figura 97)

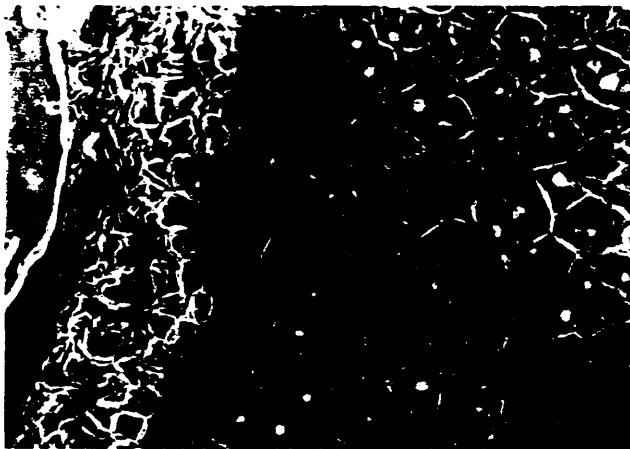


Figura 97. Felodermis externa en tumor de retama. Tinción: Safranina-Verde de Metilo. X 400.

6. PRODUCCION DE AIA.

6.1. Método de Gordon y Weber (1951)

Tras hacer las gráficas patrón descritas en III. 2.9.1. estudiamos la producción de AIA por las siete cepas de *Pseudomonas* seleccionadas (Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, PsR, PsA y PsF) y dos *Enterobacteriaceae*, las pigmentadas (Ea) y no pigmentadas (Eb).

Todas estas bacterias fueron sembradas, en las condiciones citadas en III. 2.9.1., en baño de agitación a 25° C en oscuridad, en cada uno de los siguientes medios de cultivo: Caldo Nutritivo, Caldo de Patata y Glucosa (Difco), Caldo de Patata y Glucosa (Natural), Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona. A las 24, 48, 72 y 96 horas tomábamos muestras de 1 ml., de cada uno de los 40 matraces, que eran centrifugadas. A 0.5 ml. de cada muestra se añadía 1 ml. del reactivo (Fe Cl_3 0.5 M al 2% v/v en H Cl O_4 35%), leyendo a los 30 minutos la reacción coloreada en espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm. Comparando cada absorbancia con la obtenida en la correspondiente gráfica patrón podíamos calcular la concentración de AIA en cada caso.

Los resultados obtenidos se esquematizan en las gráficas que vienen a continuación.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps 1):

Se resume en las Figuras 98 y 99.

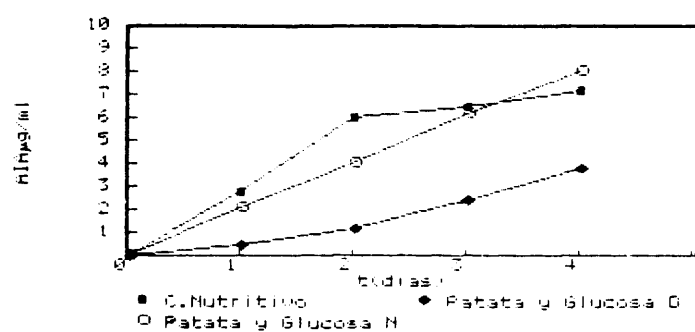


Figura 98. Producción de AIA por Ps 1 en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural)

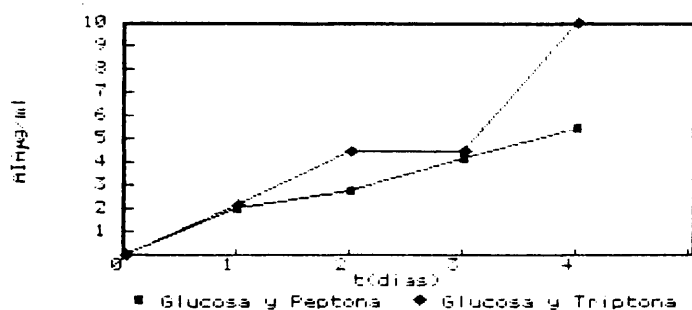


Figura 99. Producción de AIA por Ps 1 en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps 2):
(Figuras 100 y 101.)

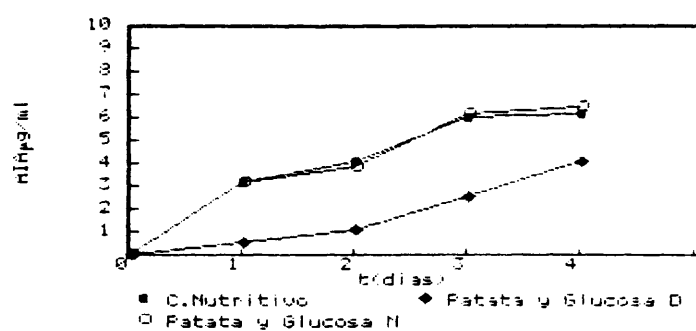


Figura 100. Producción de AIA por Ps 2 en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural).

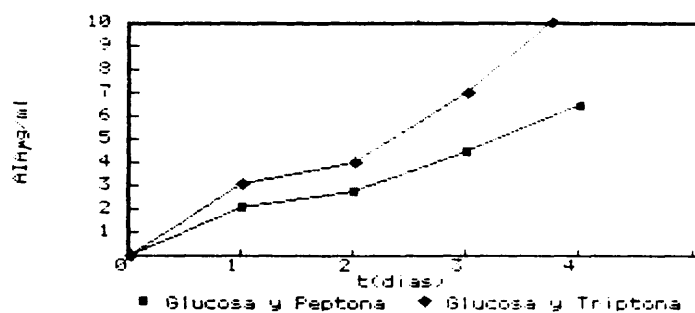


Figura 101. Producción de AIA por Ps 2 en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps 3):
(Figuras 102 y 103.)

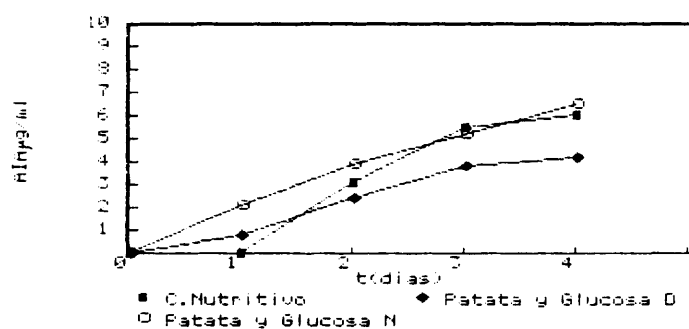


Figura 102. Producción de AIA por Ps 3 en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural).

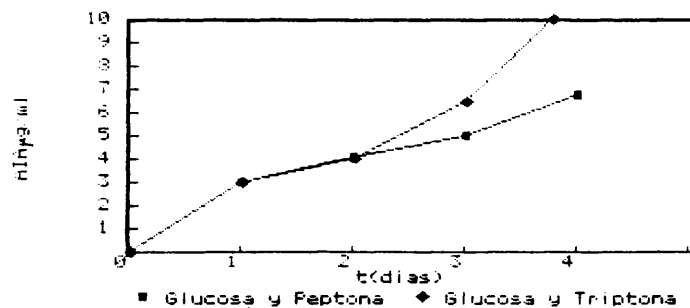


Figura 103. Producción de AIA por Ps 3 en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps 4):
(Figuras 104 y 105.)

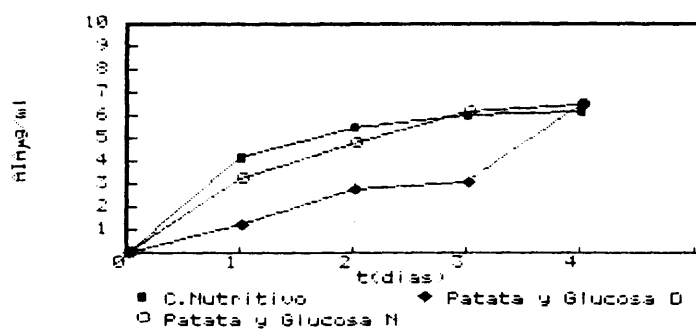


Figura 104. Producción de AIA por Ps 4 en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural).

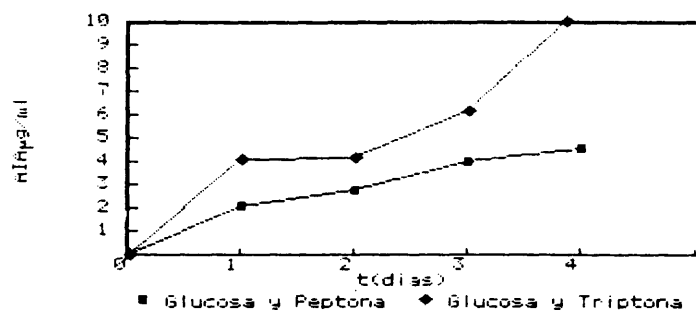


Figura 105. Producción de AIA por Ps 4 en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps R):
(Figuras 106 y 107.)

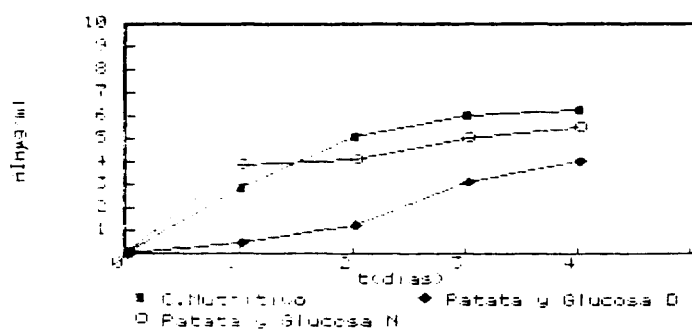


Figura 106. Producción de AIA por Ps R en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural).

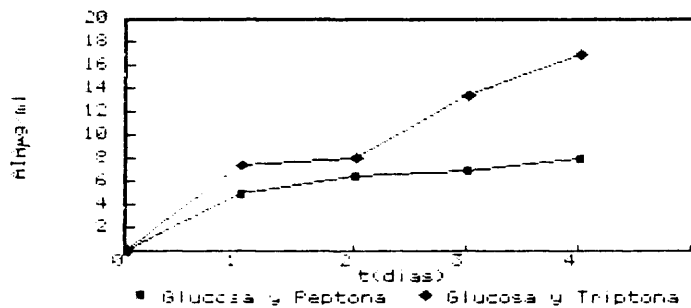


Figura 107. Producción de AIA por Ps R en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps A):
(Figuras 108 y 109.)

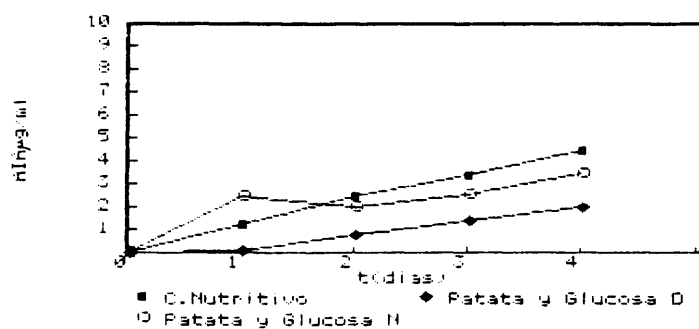


Figura 108. Producción de AIA por Ps A en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural).

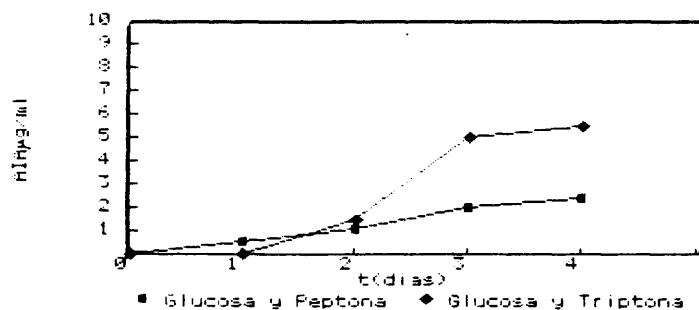


Figura 109. Producción de AIA por Ps A en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps F):
(Figuras 110 y 111.)

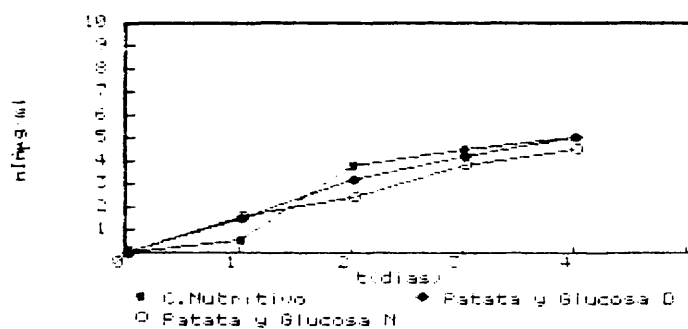


Figura 110. Producción de AIA por Ps F en Caldo Nutritivo y Caldo de Patata y Glucosa (Difco y Natural).

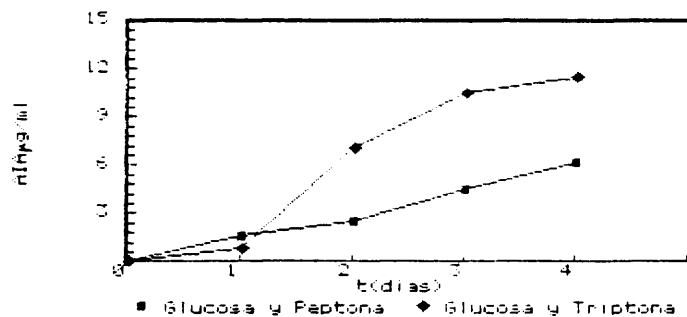


Figura 111. Producción de AIA por Ps F en Medio de Glucosa y Peptona y Medio de Glucosa y Triptona.

Ninguna de las dos Enterobacteriaceae investigadas produjeron AIA en ninguno de los medios de cultivo.

Vemos que de todos los medios de cultivo investigados, el único que destaca especialmente sobre los demás es el que hemos modificado, el Medio de Glucosa y Triptona. El Medio de Glucosa y Peptona (Medio B de Comai y Kosuge. 1981) no destaca especialmente sobre los demás, a pesar de haber sido elegido por sus autores como ideal para la producción de AIA.

6.2. Cromatografía líquida (HPLC).

Según los métodos descritos en III. 2.9.2., vamos a ver los resultados obtenidos en los mismos medios de cultivo, utilizados en el apartado anterior, empleando las siguientes cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi*: Ps 1, Ps 2, Ps 3, Ps 4, Ps A, Ps R, Ps F e IF-3026.

El número de cromatogramas ha sido en total de 320, contando sólo los básicos de determinación de concentraciones de AIA, producidas por las ocho cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi*, en los cinco medios de cultivo, a lo largo de ocho días de determinaciones. A estos hay que añadir los cromatogramas patrón que hay que efectuar cada día empleando cada medio de cultivo con concentraciones variables de AIA, repitiendo tres veces el cromatograma de cada concentración para, en caso de que haya ligeras modificaciones, elaborar una media, y los cromatogramas de los inóculos en Caldo Nutritivo, elaborados para poder determinar si la concentración de AIA detectada en las primeras horas se debía a la dilución normal de dicho inóculo.

Por tanto, el número de cromatogramas se elevaría a más de 500. Lógicamente, muchas veces hay que modificar los programas de algunas muestras, porque las variaciones de temperatura, las pequeñas modificaciones al preparar la fase móvil (en concentración, en pH...), las concentraciones de AIA en cada muestra, la composición del medio de cultivo, etc. hacen que puedan modificarse en centésimas de minuto los tiempos de retención de algunos constituyentes de la muestra.

Debido a estas razones, en primer lugar haremos un resumen de todos los cromatogramas, poniendo sólo ejemplos de las tres primeras cepas en los diferentes medios de cultivo, y, en segundo lugar iremos indicando las modificaciones que hemos hecho en el programa del integrador. En los restantes casos sólo indicaremos las variaciones de concentración de AIA que hemos detectado por este método. Las condiciones de cada cromatograma serán siempre las siguientes:

- . Inyección de muestra : 20 μ l.
- . Columna Spherisorb S5-ODS 1.
- . Fase móvil: Metanol -a. acético 1% (De 40:60 a 50:50)
- . Flujo: de 1 a 1.5 ml/min.
- . Detector: λ = 280 nm.

Los resultados obtenidos se esquematizan en las siguientes gráficas, acompañados de algunos cromatogramas de cada bacteria en los diferentes medios de cultivo.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps1).

En Caldo Nutritivo. (Figura 112.)

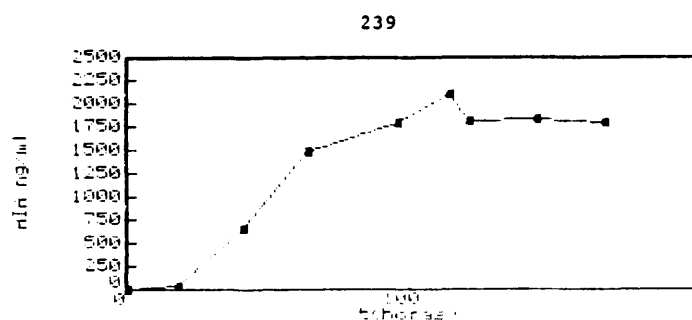


Figura 112. Producción de AIA por Ps1 en Caldo Nutritivo.

Vemos que en este medio de cultivo el AIA comienza a detectarse a las 18 h. de incubación como se ve en el primer cromatograma (Figura 113.)

TT = 0.01	TF = "II	TV = 1
TT = 0.002	TF = "AT	TV = 4096
TT = 5.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.02	TF = "AT	TV = 64
TT = 5.03	TF = "II	TV = 0
TT = 7	TF = "ER	TV = 1



Figura 113. Cromatograma de cultivo (18 horas) de Ps1 en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 114.)

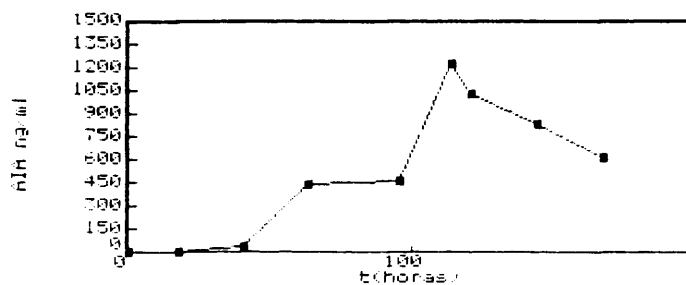


Figura 114. Producción de AIA por Ps1 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En la Figura 115, vemos un cromatograma tipo.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 5.5	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.51	TF = "AT	TV = 64
TT = 5.52	TF = "II	TV = 0
TT = 6.5	TF = "AT	TV = 4096
TT = 6.51	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

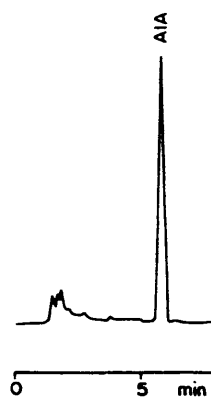


Figura 115. Cromatograma de cultivo (64 horas) de Ps1 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

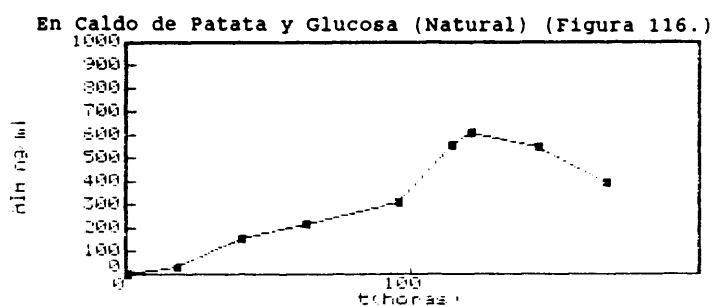


Figura 116. Producción de AIA por Ps1 en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En la Figura 117 vemos un cromatograma representativo de este cultivo.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 5.10	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.11	TF = "AT	TV = 64
TT = 5.12	TF = "II	TV = 0
TT = 6.25	TF = "AT	TV = 4096
TT = 6.26	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

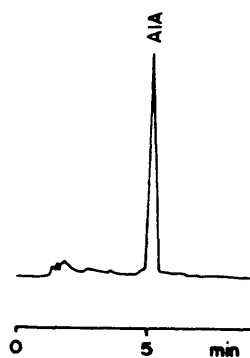


Figura 117. Cromatograma de cultivo (64 horas) de Ps1 en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).



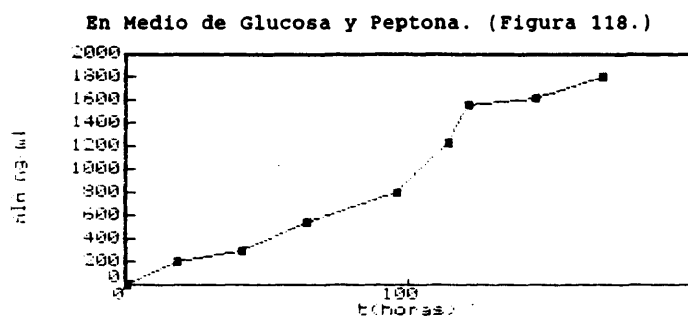


Figura 118. Producción de AIA por Ps1 en Medio de Glucosa y Peptona.

En este medio, como vemos en la Figura 119 es necesario cambiar la atenuación del pico de AIA a 128 en el cultivo de 114 horas.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.98	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.99	TF = "AT	TV = 128
TT = 5	TF = "II	TV = 0
TT = 5.98	TF = "AT	TV = 4096
TT = 5.99	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

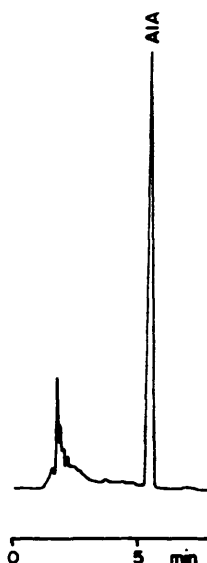


Figura 119. Cromatograma de cultivo (114 horas) de Ps1 en Medio de Glucosa y Peptona.

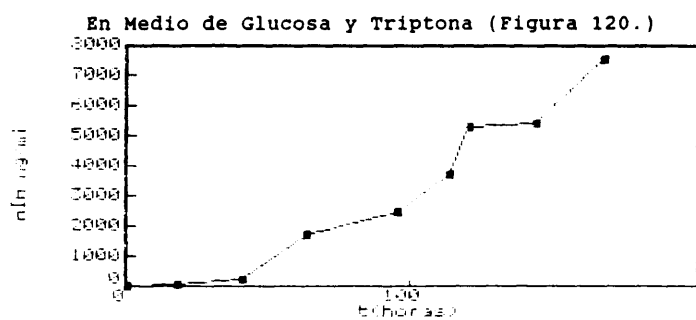


Figura 120. Producción de AIA por Ps1 en Medio de Glucosa y Triptona.

En este medio, al ser superior la producción de AIA, cambiamos la atenuación a 128 a las 96 horas (Figura 121).

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.75	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.76	TF = "AT	TV = 128
TT = 4.77	TF = "II	TV = 1
TT = 6	TF = "AT	TV = 4096
TT = 6.01	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

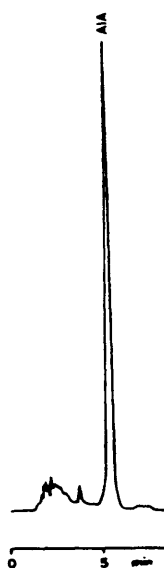


Figura 121. Cromatograma de cultivo (96 horas) de Ps1 en Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps2).
En Caldo Nutritivo. (Figura 122.)

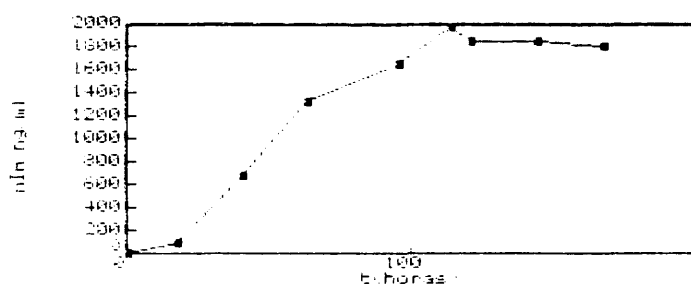


Figura 122. Producción de AIA por Ps2 en Caldo Nutritivo.

En este medio de cultivo, aunque la producción final de AIA no llega a ser tan notable como en el Medio de Glucosa y Triptona, es suficientemente rápida en los primeros momentos (de 1 a 3 días) para que podamos emplearlo, por su mayor sencillez, en el análisis cualitativo de la producción de AIA. Es decir, puede substituir a las pruebas de patogeneidad por inoculación a la planta sensible. Por ejemplo, en la Figura 123 vemos en el cromatograma realizado a las 41 horas como el pico del AIA es ya bastante notable.

TT = 0.01	TF = "II	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 5.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.02	TF = "AT	TV = 64
TT = 5.03	TF = "II	TV = 0
TT = 7	TF = "ER	TV = 1



Figura 123. Cromatograma de cultivo (41 horas) de Ps2 en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco). (Figura 124)

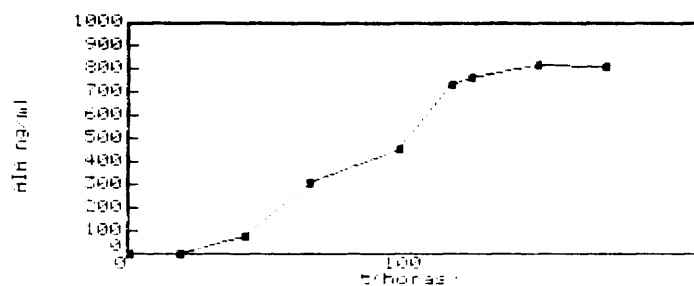


Figura 124. Producción de AIA por Ps2 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En este medio de cultivo la producción de AIA comienza más tardíamente, en ningún caso se detecta a las 18 horas, debiendo incubarse al menos 2 días (Figura 125) para revelar una pequeña concentración.

TT = 0.01	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.02	TF = "II	TV = 1
TT = 5	TF = "AT	TV = 64
TT = 5.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.02	TF = "II	TV = 0
TT = 6.20	TF = "II	TV = 1
TT = 6.21	TF = "AT	TV = 4096
TT = 12	TF = "ER	TV = 1



Figura 125. Cromatograma de cultivo (41 horas) de Ps2 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural). (Figura 126)

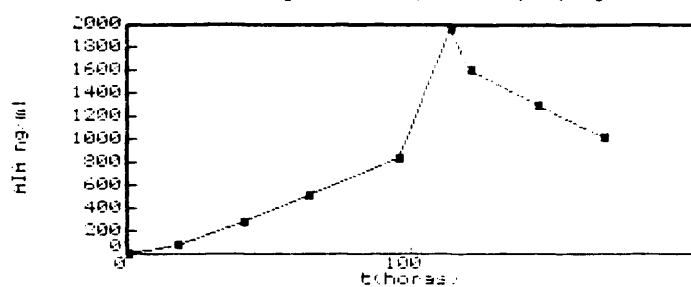


Figura 126. Producción de AIA por Ps2 en Caldo de Patata y Glucosa Natural.

Al contrario que en el Medio de Difco, en este, salvo en un caso, se detecta ya la producción de AIA a las 18 horas (Figura 127).

TT = 0.01	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.02	TF = "II	TV = 1
TT = 5.25	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.26	TF = "II	TV = 0
TT = 5.27	TF = "AT	TV = 64
TT = 6	TF = "AT	TV = 4096
TT = 6.01	TF = "II	TV = 1
TT = 11	TF = "ER	TV = 1

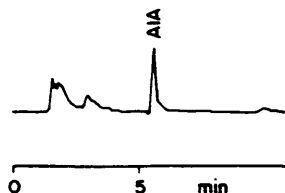


Figura 127. Cromatograma de cultivo (18 horas) de Ps2 en Caldo de Patata y Glucosa Natural.

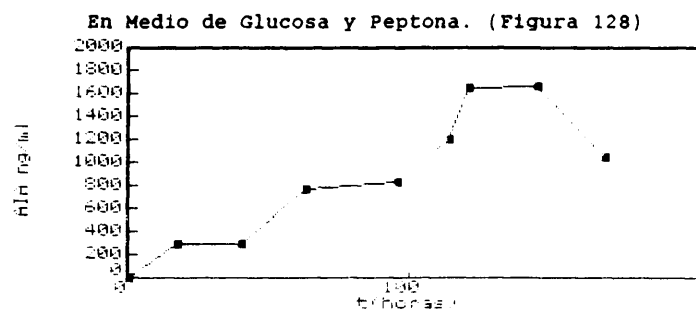


Figura 128. Producción de AIA por Ps2 en Medio de Glucosa y Peptona.

Como en el caso de Ps1, cuando la producción de AIA es ya muy elevada (Figura 129) hay que cambiar la atenuación del pico correspondiente a 128.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.98	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.99	TF = "AT	TV = 128
TT = 5	TF = "II	TV = 0
TT = 5.98	TF = "AT	TV = 4096
TT = 5.99	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1



Figura 129. Cromatograma de cultivo (121 horas) de Ps2 en Medio de Glucosa y Peptona.

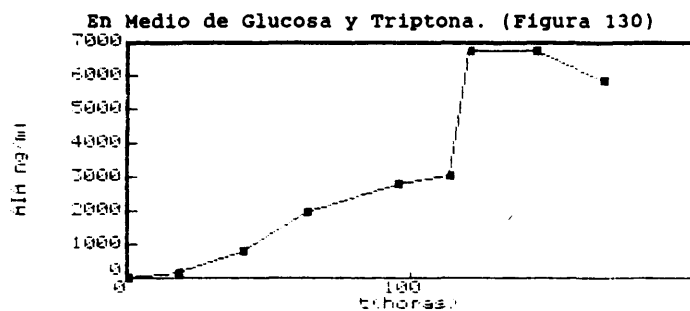


Figura 130. Producción de AIA por Ps2 en Medio de Glucosa y Triptona.

En este caso, desde las 64 horas (Figura 131) hay que cambiar la atenuación a 256, y a las 121 horas a 512.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.8	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.81	TF = "AT	TV = 256
TT = 4.82	TF = "II	TV = 0
TT = 5.98	TF = "AT	TV = 4096
TT = 5.99	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

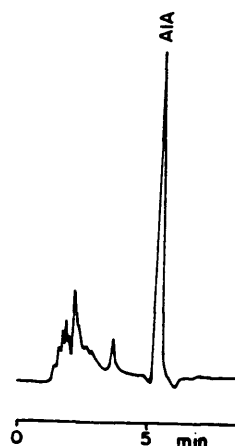


Figura 131. Cromatograma de cultivo (64 horas) de Ps2 en Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps3).

En Caldo Nutritivo. (Figura 132)

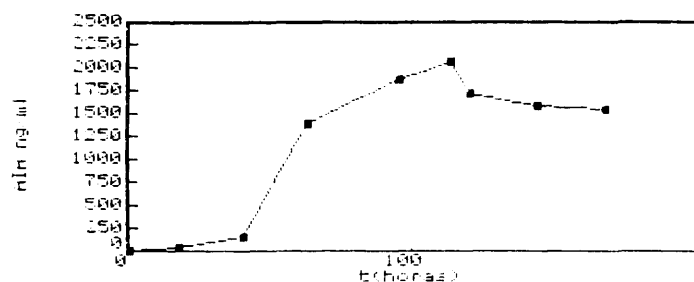


Figura 132. Producción de AIA por Ps3 en Caldo Nutritivo.

En este medio de cultivo, a pesar de alcanzarse un nivel en el que en otros hay que aumentar la atenuación a 128 ó 256, no es necesario hacer tal cosa, puesto que al ser los picos más anchos (Figura 133) no llegan a superar en altura al papel del integrador.

TT = 0.01	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.02	TF = "II	TV = 1
TT = 5.5	TF = "AZ	TV = 1
TT = 5.51	TF = "II	TV = 0
TT = 5.52	TF = "AT	TV = 64
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

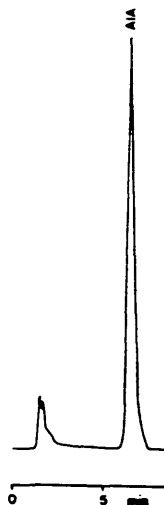


Figura 133. Cromatograma de cultivo (114 horas) de Ps3 en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco). (Figura 134).

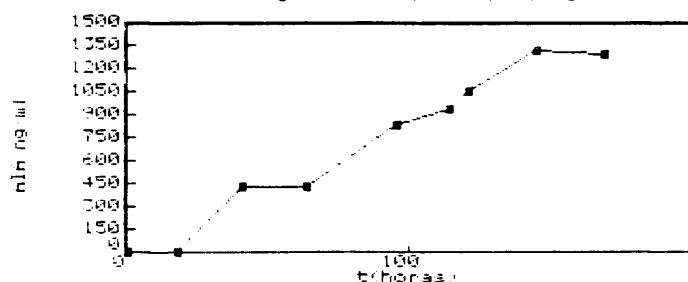


Figura 134. Producción de AIA por Ps3 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

Aún siendo la producción de AIA en este medio inferior al anterior, los picos son más estrechos y altos, por lo que aumentamos la atenuación a 128 a las 145 horas. (Figura 135)

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.8	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.81	TF = "AT	TV = 128
TT = 4.82	TF = "II	TV = 0
TT = 6.25	TF = "AT	TV = 4096
TT = 6.26	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

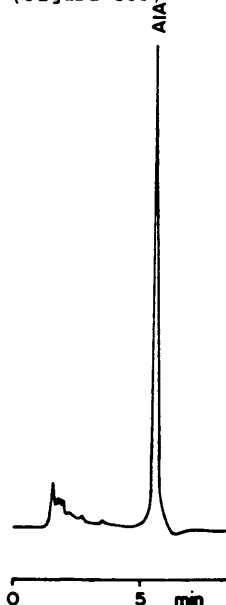


Figura 135. Cromatograma de cultivo (145 horas) de Ps3 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural). (Figura 136)

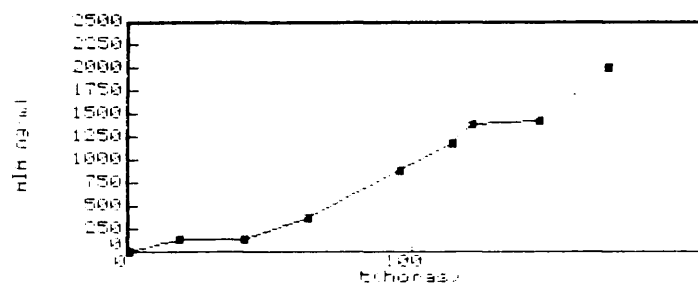


Figura 136. Producción de AIA por Ps3 en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En la Figura 137 podemos ver un cromatograma tipo de este cultivo.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.8	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.81	TF = "AT	TV = 128
TT = 4.82	TF = "II	TV = 0
TT = 6.25	TF = "AT	TV = 4096
TT = 6.26	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

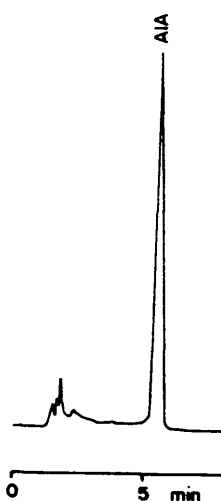


Figura 137. Cromatograma de cultivo (145 horas) de Ps3 en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

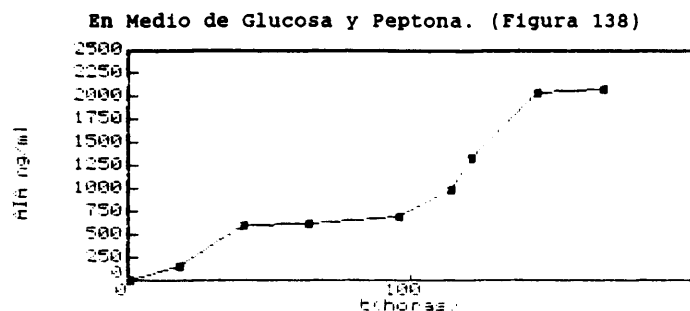


Figura 138. Producción de AIA por Ps3 en Medio de Glucosa y Peptona.

En este cultivo, a las 18 horas, aunque la producción de AIA no es la más elevada (170 ng/ml.), la altura que alcanza el pico correspondiente a la Figura 139 hace que el Medio de Glucosa y Peptona pueda ser ideal para la detección del producto en los primeros momentos.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.49	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.5	TF = "AT	TV = 64
TT = 4.51	TF = "II	TV = 0
TT = 6.20	TF = "II	TV = 1
TT = 6.21	TF = "AT	TV = 4096
TT = 11	TF = "ER	TV = 1

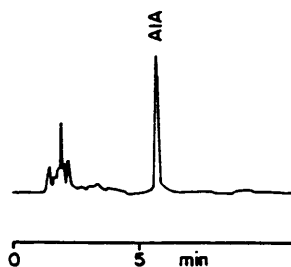


Figura 139. Cromatograma de cultivo (18 horas) de Ps3 en Medio de Glucosa y Peptona.

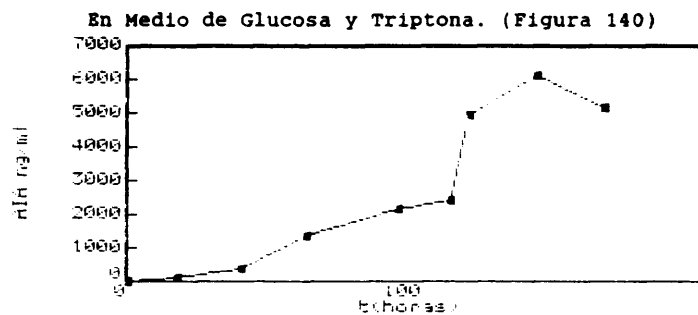


Figura 140. Producción de AIA por Ps3 en Medio de Glucosa y Triptona.

Como en todos los casos descritos, en este medio de cultivo hay que ir aumentando continuamente la atenuación hasta 512 (Figura 141) debido a la elevada concentración de AIA obtenida.

TT = 0.01	TF = "AZ	TV = 1
TT = 0.02	TF = "AT	TV = 4096
TT = 0.03	TF = "II	TV = 1
TT = 4.8	TF = "AZ	TV = 1
TT = 4.81	TF = "AT	TV = 512
TT = 4.82	TF = "II	TV = 0
TT = 5.98	TF = "AT	TV = 4096
TT = 5.99	TF = "II	TV = 1
TT = 8	TF = "ER	TV = 1

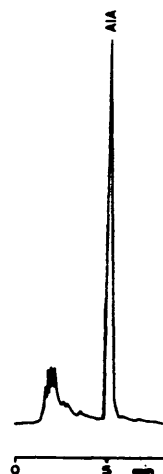


Figura 141. Cromatograma de cultivo (145 horas) de Ps3 en Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps4).
En Caldo Nutritivo. (Figura 142)

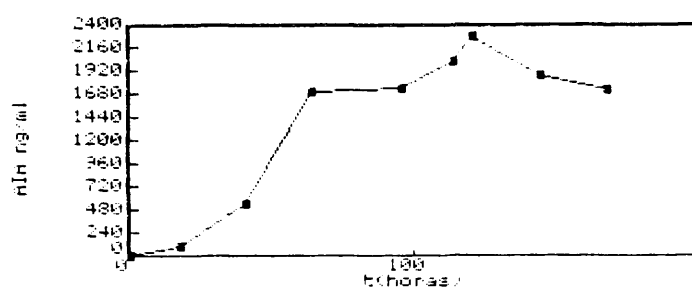


Figura 142. Producción de AIA por Ps4 en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco). (Figura 143)

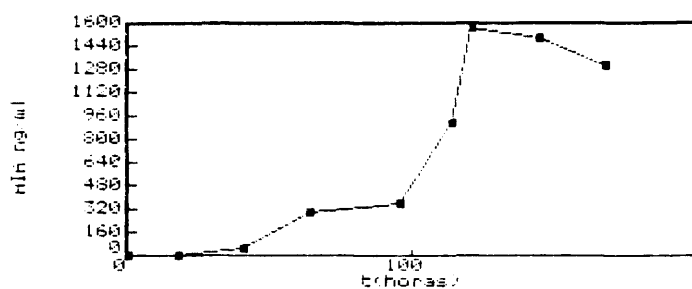


Figura 143. Producción de AIA por Ps4 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural). (Figura 144).

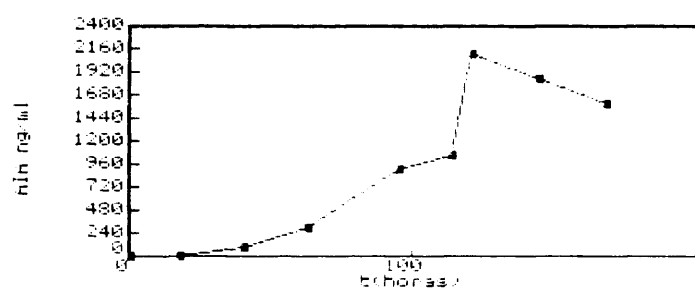


Figura 144. Producción de AIA por Ps4 en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona. (Figura 145)

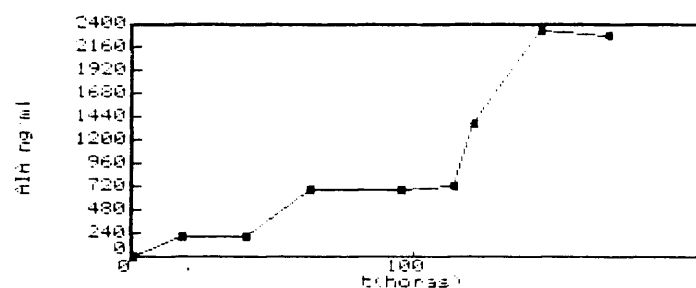


Figura 145. Producción de AIA por Ps4 en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona. (Figura 146)

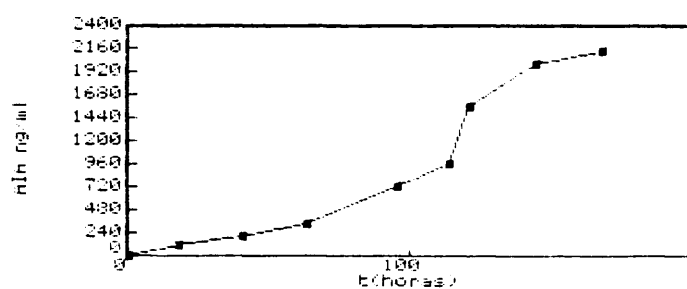


Figura 146. Producción de AIA por Ps4 en Medio de Glucosa y Triptona.

-Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (IF 3026).

En Caldo Nutritivo (Figura 147).

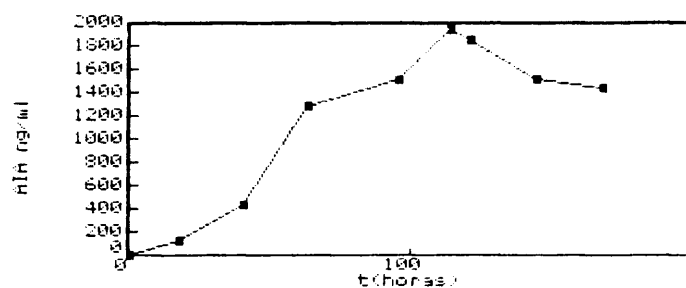


Figura 147. Producción de AIA por IF 3026 en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 148).

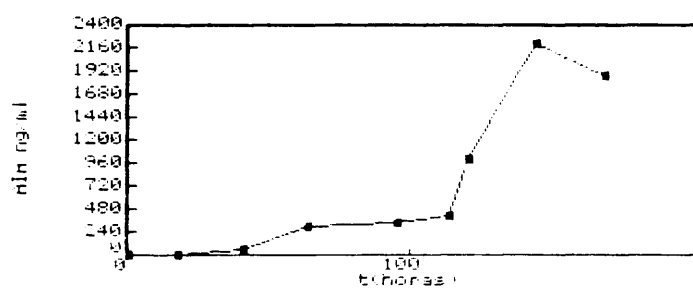


Figura 148. Producción de AIA por IF 3026 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural)(Figura 149).

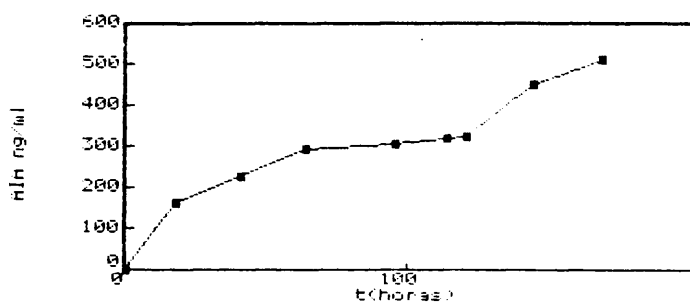


Figura 149. Producción de AIA por IF 3026 en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona. (Figura 150)

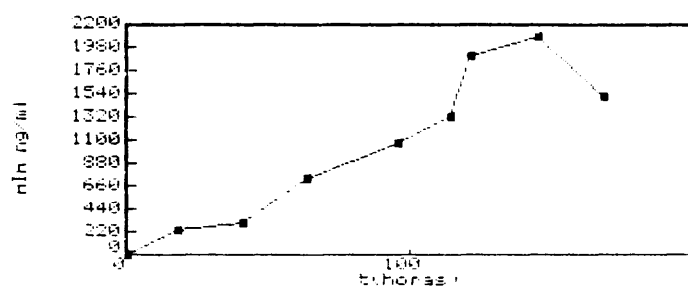


Figura 150. Producción de AIA en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona. (Figura 151).

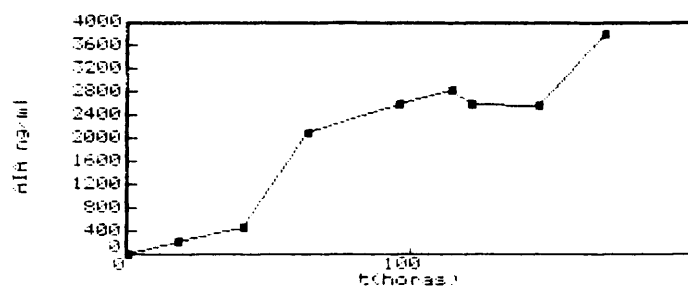


Figura 151. Producción de AIA por IF 3026 en Medio de Glucosa y Triptona.

-Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (PsR).
En Caldo Nutritivo (Figura 152).

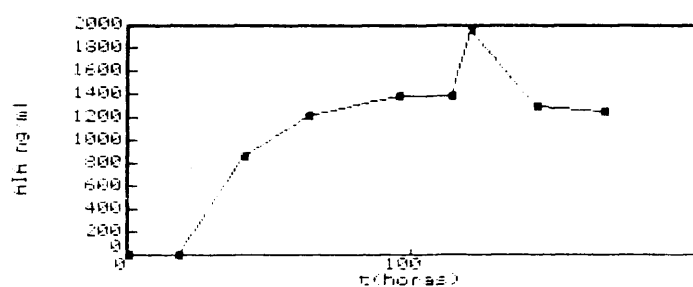


Figura 152. Producción de AIA por PsR en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco). (Figura 153)

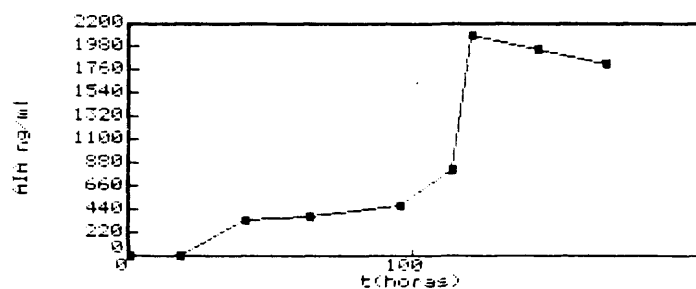


Figura 153. Producción de AIA por PsR en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 154)

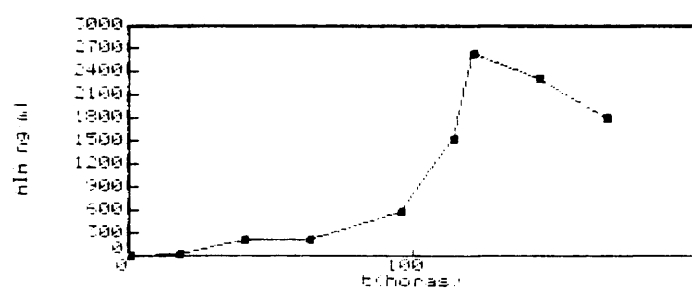


Figura 154. Producción de AIA por PsR en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 155).

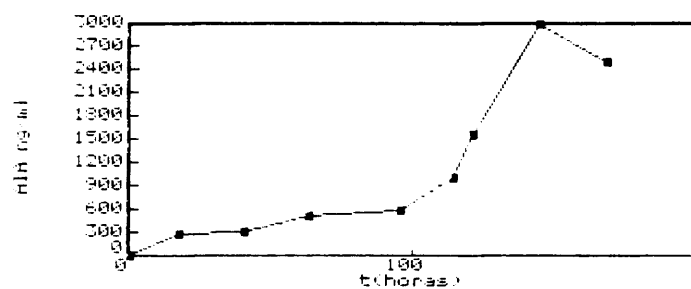


Figura 155. Producción de AIA por PsR en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 156)

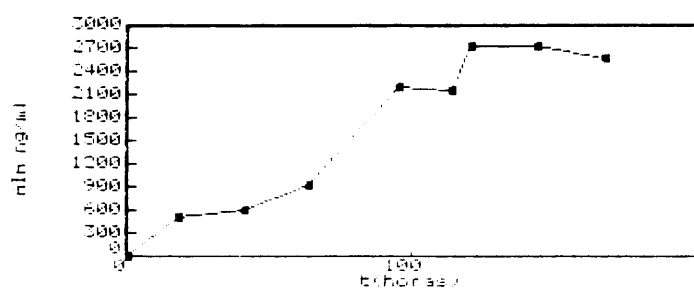


Figura 156. Producción de AIA por PsR en Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (PsA)

En Caldo Nutritivo (Figura 157)

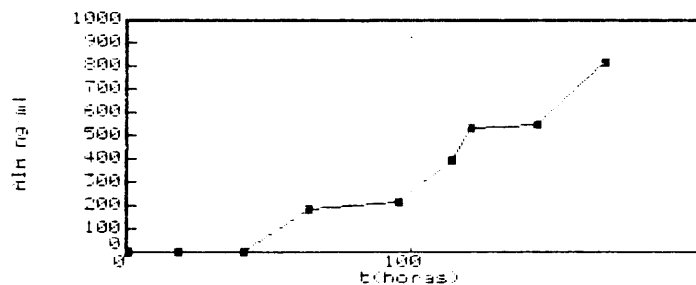


Figura 157. Producción de AIA por PsA en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 158)

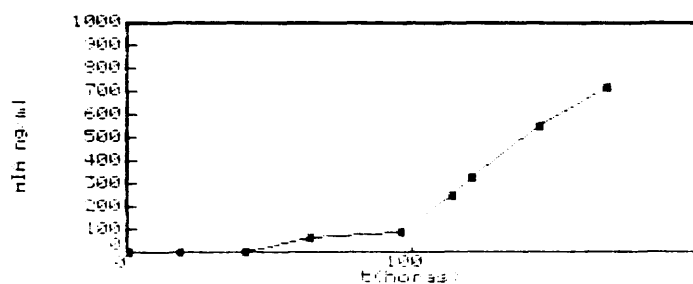


Figura 158. Producción de AIA por PSA en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 159)

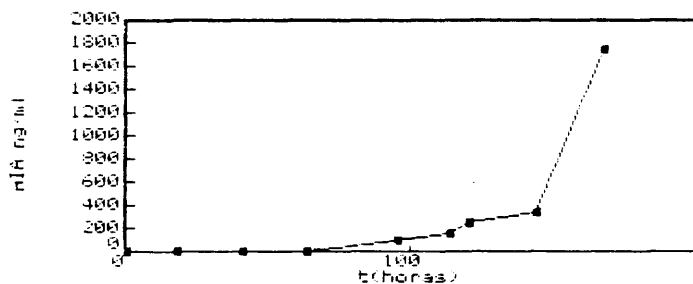


Figura 159. Producción de AIA por PSA en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 160).

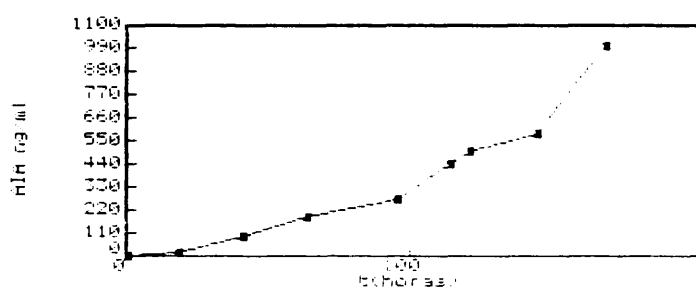


Figura 160. Producción de AIA por PsA en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 161).

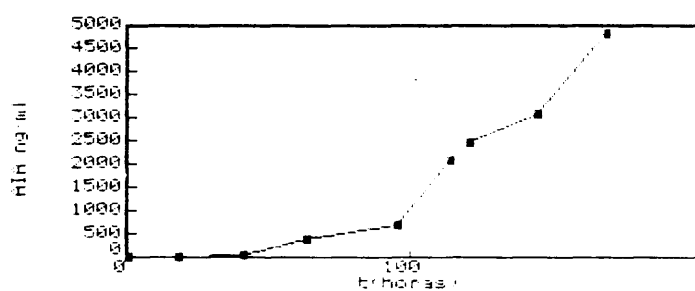


Figura 161. Producción de AIA por PsA en Medio de Glucosa y Triptona.

-Producción de AIA por *P. syringae* pv. *savastanoi* (PsF).
En Caldo Nutritivo (Figura 162).

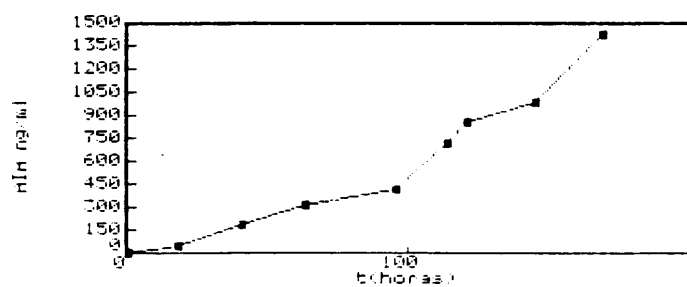


Figura 162. Producción de AIA por PsF en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 163).

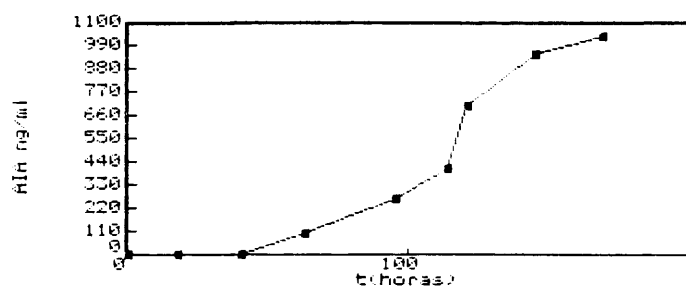


Figura 163. Producción de AIA por PsF en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 164).

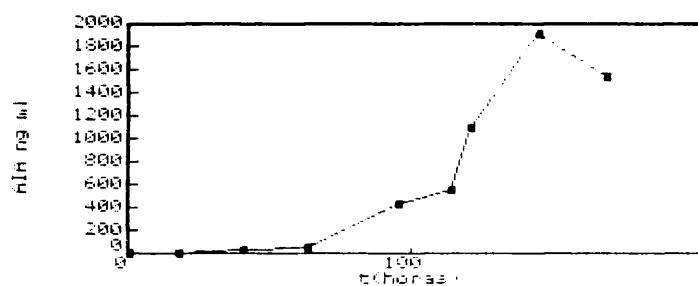


Figura 164. Producción de AIA por PsF en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 165).

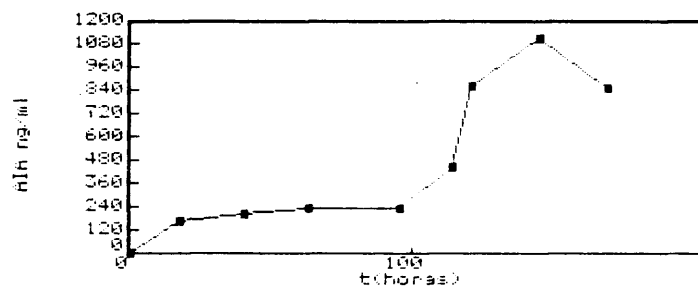


Figura 165. Producción de AIA por PsF en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 166).

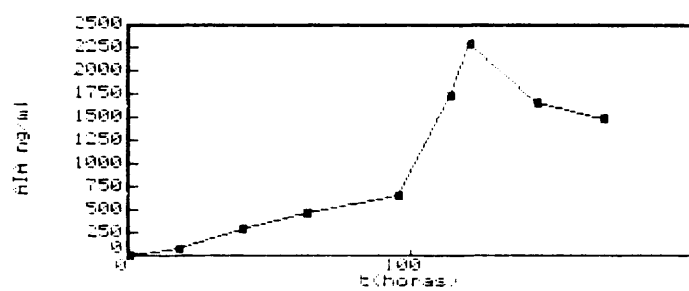


Figura 166. Producción de AIA por PsF en Medio de Glucosa y Triptona.

7. PRODUCCION DE SIRINGOMICINA.

7.1. Análisis cualitativo.

En primer lugar hemos analizado la producción de fitotoxinas por las ocho cepas estudiadas (Ps 1, Ps 2, Ps 3, Ps 4, IF-3026, Ps R, Ps A y Ps F). Según el método de Gross y De Vay (1976, 1977, 1985) descrito en III. 2.10.1., controlando en cada paso la actividad biológica frente a *Geotrichum candidum* por los distintos métodos descritos en dicho apartado.

Ya en el primer paso, en el cultivo, establecíamos un control para saber si había o no fitotoxina. Para ello sembrábamos *Geotrichum candidum* en placas de Agar Mueller Hinton, medio que asegura una mejor difusión de la toxina, y sobre dicha siembra depositábamos 20 μ l de cada cultivo previamente centrifugado y filtrado, incubando a 25° C. Este mismo método fué el empleado en el estudio de la variabilidad de *P. syringae* pv. *savastanoi* (IV.1.3.), en el que afirmábamos que todas las cepas estudiadas tenían como caracter en común la producción de Siringomicina (Figura 167)

El extracto acetónico centrifugado y previo a la concentración era sometido a control por HPLC. En este paso ya podíamos saber si la fitotoxina producida era la misma por el tiempo de retención obtenido en el cromatograma. (Figura 169).

Una vez concentrado en rotavapor el extracto acetónico, volvíamos a controlar la actividad antibiótica sobre *G. candidum*. este control lo realizábamos por cualquiera de los métodos descritos, por ejemplo, mediante discos con 25 μ l del extracto desecado. (Figura 168)



Figura 167. Pruebas de actividad de cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* cultivadas en Caldo de Patata y Glucosa (Natural) sobre *G. candidum* en Agar Mueller Hinton. En la placa superior derecha hay un control en el que se ha depositado el medio de cultivo estéril.

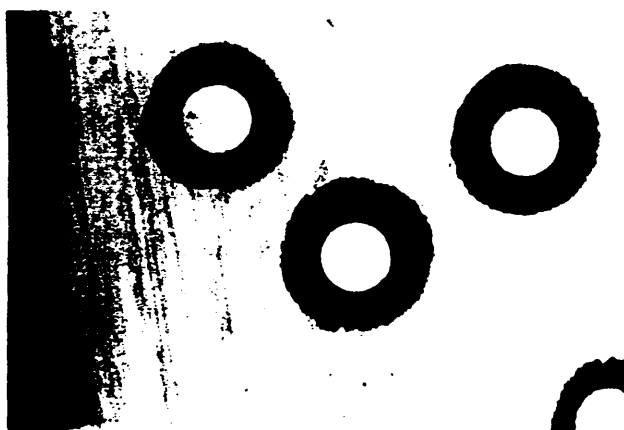


Figura 168. Pruebas de actividad con 25 μ l. de extracto acetónico desecado sobre *G. candidum*

Fase móvil: Metanol-agua (85:15)

Inyección: 10 μ l de muestra diluida
en 10 μ l de fase móvil.

Columna: Spherisorb S5-ODS 2

Flujo: 0.5 ml/min.

Detector uv: λ = 254 nm.

Registro: 20 cm/h.

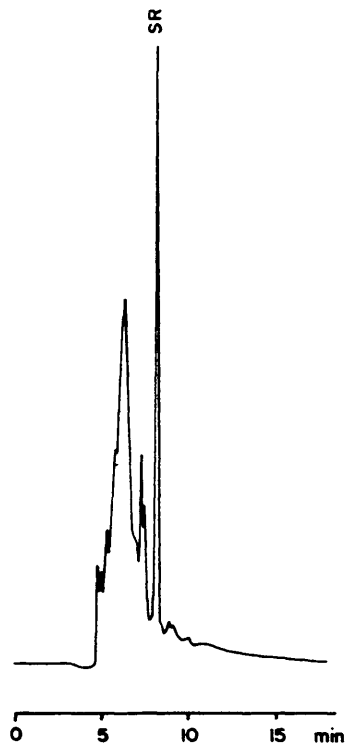


Figura 169. Cromatograma de un extracto acetónico de un cultivo de cuatro días de Ps 1 en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

Cada uno de los extractos butanólicos y sus correspondientes fases acuosas eran de nuevo controladas y comparadas las pérdidas de actividad, puesto que en este paso es uno de los que comienzan a darse (Figura 170).

Una vez mezclados y concentrados los tres extractos butanólicos eran ajustados a 4 ml. en HCl pH 3. A partir de esta solución en a. clorhídrico determinabamos el número de unidades de actividad de SR según el método de Sindén et al. (1971), sometiendo el extracto a doce diluciones doble progresivas, tomando 10 μ l de cada dilución que eran depositados sobre *G. candidum* sembrando en césped en la superficie de placas de Agar Glucosado con Patata. La dilución que inhibía completamente el crecimiento de *G. candidum* en el área de aplicación de los 10 μ l era considerada como una unidad de SR. De esta forma hacíamos el cálculo del número de unidades que teníamos en el extracto clorhídrico (Figura 171). En esta Figura vemos como la dilución 1/1024 es la crítica (compartimento inferior derecho), la que inhibe el crecimiento en el punto de aplicación, mientras que la siguiente (1/2048) produce sólo una inhibición parcial (compartimento superior al citado).

El extracto clorhídrico era purificado empleando columnas de carboximetilcelulosa (CM - 52) o de fosfocelulosa (P - 11) en las condiciones descritas en III.2.10.1., recogiendo fracciones, probando su actividad antibiótica sobre *G. candidum* y cromatografiando las fracciones positivas en las condiciones que definimos en III.2.10.2.

Tras la purificación final en columna de Sephadex

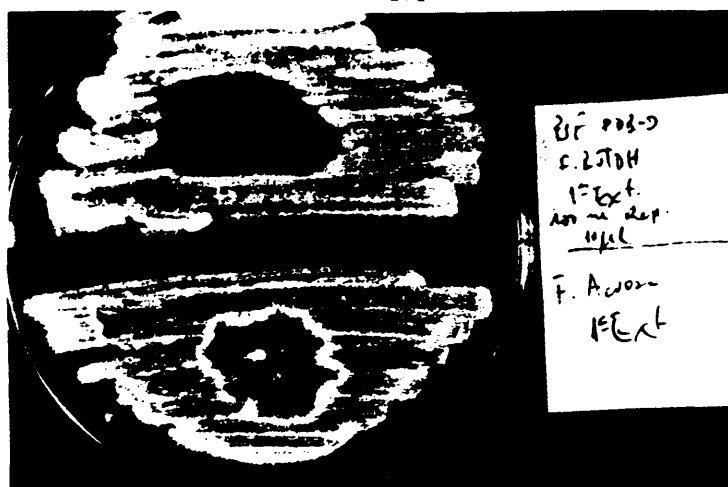


Figura 170. Prueba de actividad antibiótica de la primera extracción con butanol (arriba) y su correspondiente fase acuosa (abajo) de un cultivo de PsF en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

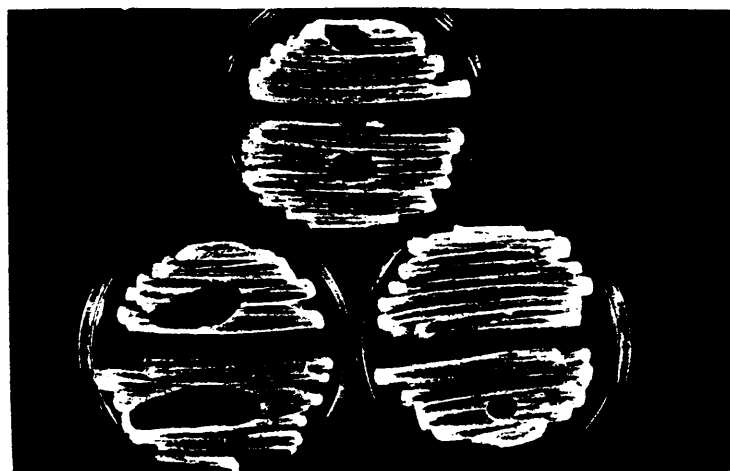


Figura 171. Determinación de la cantidad de unidades de SR según el método de Sindén et al.

G-15, de nuevo probábamos la actividad antibiótica y cromatografiábamos las fracciones positivas para estar seguros de que había eluido sólo un pico en el cromatograma.

En las ocho cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* obteníamos el mismo producto, con la misma actividad biológica, por lo que podíamos afirmar que se trataba, en todos los casos, de la misma fitotoxina. Aunque no encontramos diferencia a nivel cualitativo, si las hemos encontrado a nivel cuantitativo, como veremos más adelante.

7.2. Estudio del rendimiento en el proceso de purificación de Siringomicina.

Este estudio lo realizamos empleando el método de Sindén et al. (1971) para determinar el número de unidades de actividad de SR que íbamos obteniendo en cada paso, y poder establecer las diferencias cuantitativas entre las distintas cepas en el paso más favorable.

Como ejemplo, estudiamos las pérdidas de actividad de la cepa Ps 1 cultivada en Caldo de Patata y Glucosa (Natural):

Fracción	Unidades SR	Rendimiento %
Solución acetona-HCl	256.000	100
Extracto butanólico	204.800	80
Fase acuosa	51.200	20
Columna CM - 52	153.600	60
Columna Sephadex G - 15	128.000	50

El hecho de que nos salgan unos valores tan exactos en los números de unidades de SR y en los rendimientos hay que buscarlo en el método de las diluciones de Sinden et al. (1971) y considerando el volumen de cada fracción.

La primera fracción, con un volumen de 500 ml. (250 de cultivo y 250 de acetona - HCl), nos daba un resultado de 512 unidades de SR/ml.

El extracto butanólico, con 200 ml. de volumen, nos daba 1024 unidades de SR/ml.

En el paso de la columna CM - 52, recogimos tres fracciones de 50 ml. , las de pH 2.2, 2.3 (con la máxima actividad) y 2.4, que reunidas y ensayadas nos proporcionaban también 1024 unidades /ml.

En la columna de Sephadex G - 15 colectamos 250 ml. con una actividad de 512 unidades /ml.

Quedaba claro que para comparar cuantitativamente la producción de fitotoxina no se podía realizar completamente toda la purificación, puesto que las pérdidas en rendimiento podían variar, sobre todo de una columna a otra, aún siendo del mismo relleno. Por tanto, a la hora de la comparación, nos decidimos por la primera fracción de cada cultivo.

7.3. Análisis cuantitativo.

Teniendo en cuenta las limitaciones del método de Sinden et al. (1971) para valorar la cantidad de fitotoxina, los resultados expuestos a continuación deben ser juzgados como una simple comparación y no como determinaciones exactas.

Todas las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi*

procedentes de *Olea europaea* (Ps 1, Ps 2, Ps 3, Ps 4 e IF 3026) nos proporcionaron los mismos resultados en los diferentes medios de cultivo, como vemos en los gráficos que mostramos a continuación.

- Producción de SR por *P. syringae* pv. *savastanoi* (Cepas procedentes de *Olea europaea*).

En Caldo Nutritivo (Figura 172).

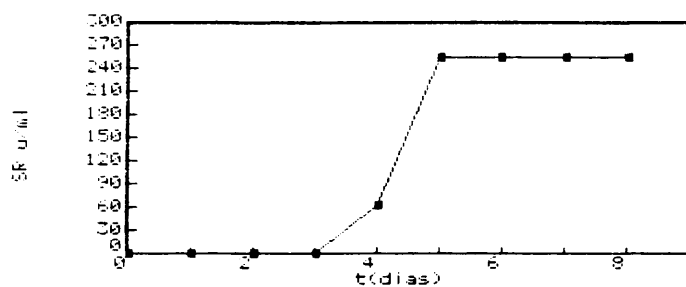


Figura 172. Producción de SR en Caldo Nutritivo por *P. syringae* pv. *savastanoi* procedente de olivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 173).

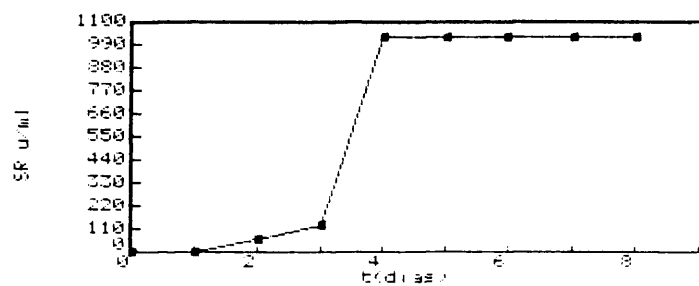


Figura 173. Producción de SR en Caldo de Patata y Glucosa (Difco) por *P. syringae* pv. *savastanoi* procedente de olivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 174).

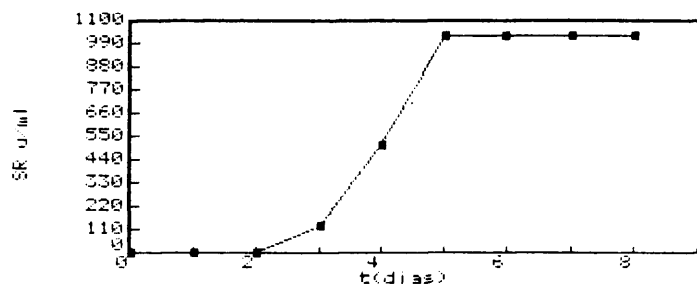


Figura 174. Producción de SR en Caldo de Patata y Glucosa (Natural) por *P. syringae* pv. *savastanoi* procedente de olivo

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 175).

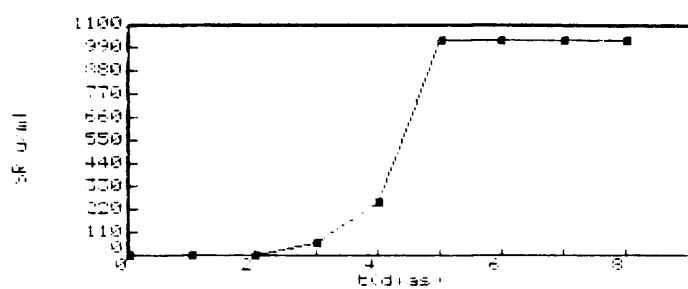


Figura 175. Producción de SR en Medio de Glucosa y Peptona por *P. syringae* pv. *savastanoi* procedente de olivo.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 176).

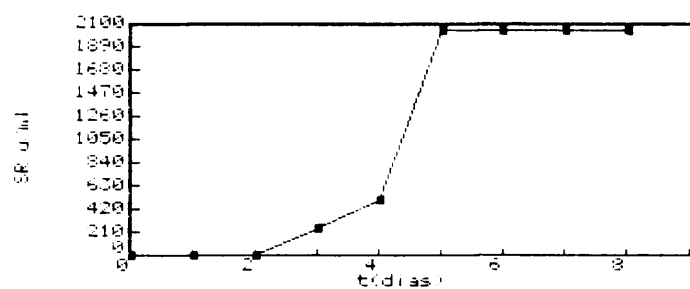


Figura 176. Producción de SR en Medio de Glucosa y Triptona por *P. syringae* pv. *savastanoi* procedente de olivo.

-Producción de SR por *P. syringae* pv. *savastanoi* (PsR).
En Caldo Nutritivo (Figura 177).

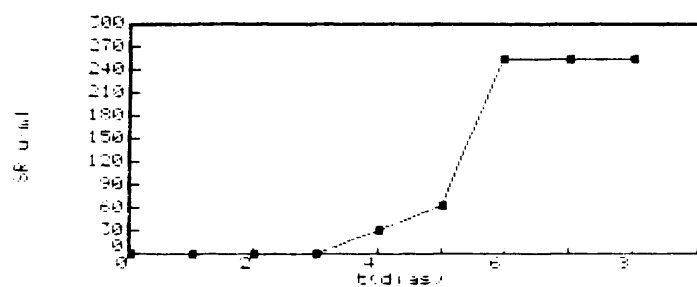


Figura 177. Producción de SR por PsR en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 178).

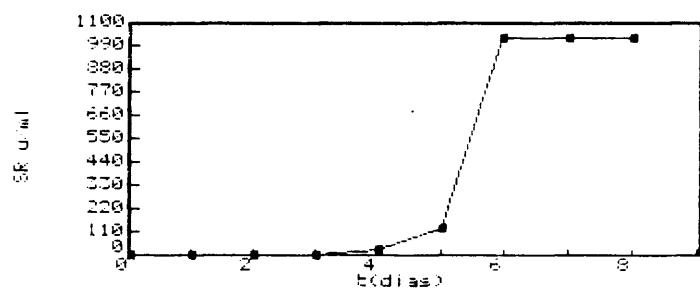


Figura 178. Producción de SR por PsR en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 179).

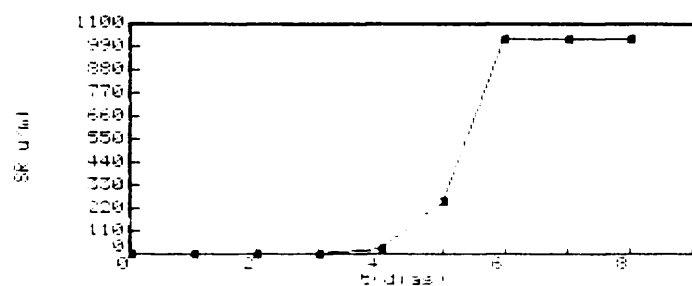


Figura 179. Producción de SR por PsR en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 180).

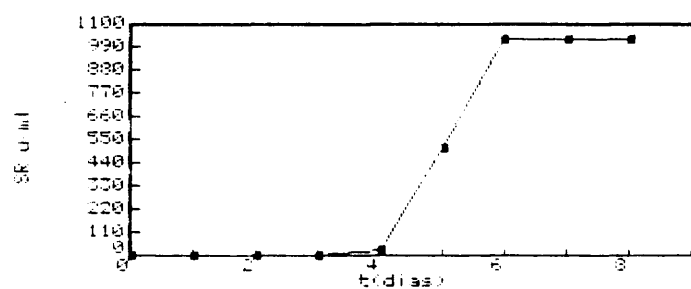


Figura 180. Producción de SR por PsR en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 181).

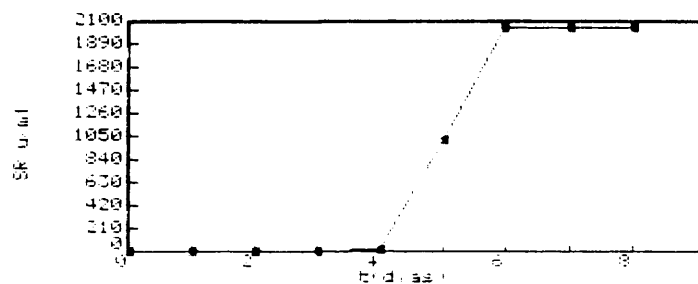


Figura 181. Producción de SR por PsR en Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de SR por *P. syringae* pv. *savastanoi* (PsA).

En Caldo Nutritivo (Figura 182).

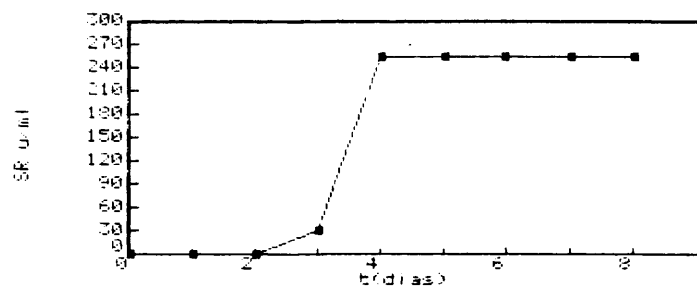


Figura 182. Producción de SR por PsA en Caldo Nutritivo.

En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 183).

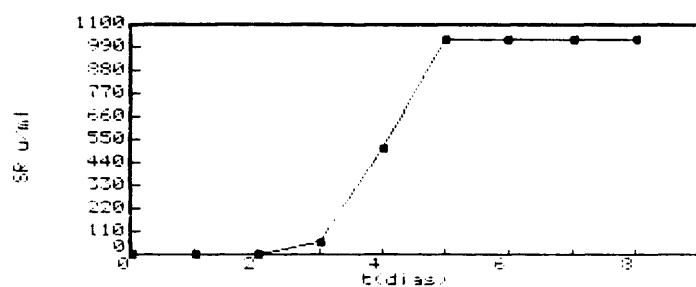


Figura 183. Producción de SR por PsA en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 184).

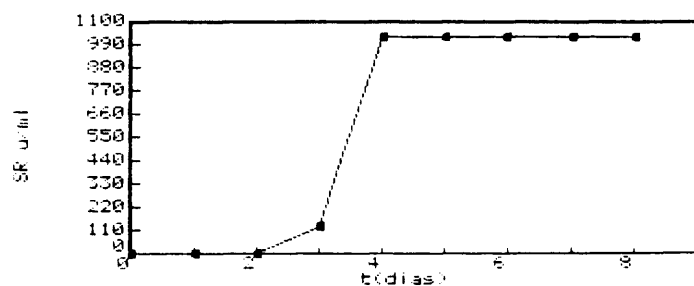


Figura 184. Producción de SR por PsA en Caldo de Patata y Glucosa (Natural).

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 185).

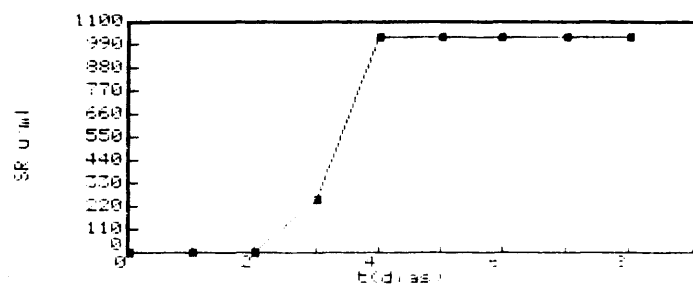


Figura 185. Producción de SR por PsA en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 186).

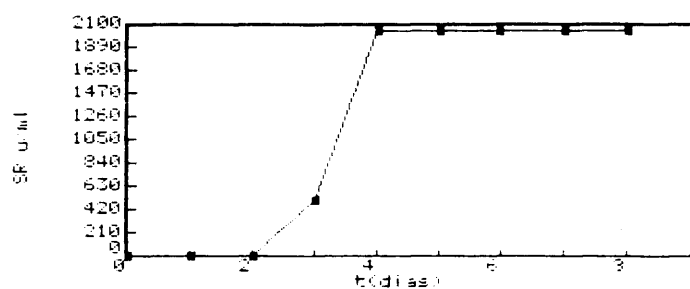


Figura 186. Producción de SR por PsA en Medio de Glucosa y Triptona.

- Producción de SR por *P. syringae* pv. *savastanoi* (PsF).
En Caldo Nutritivo (Figura 187).

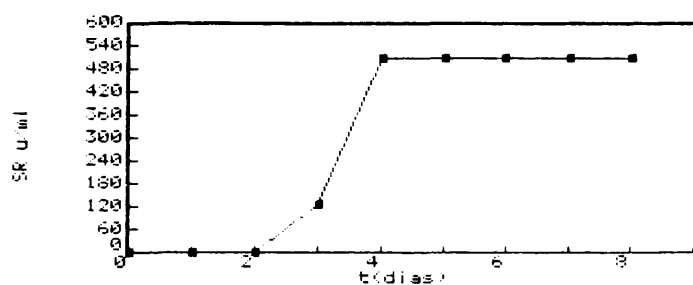


Figura 187. Producción de SR por PsF en Caldo Nutritivo.

- En Caldo de Patata y Glucosa (Difco) (Figura 188).

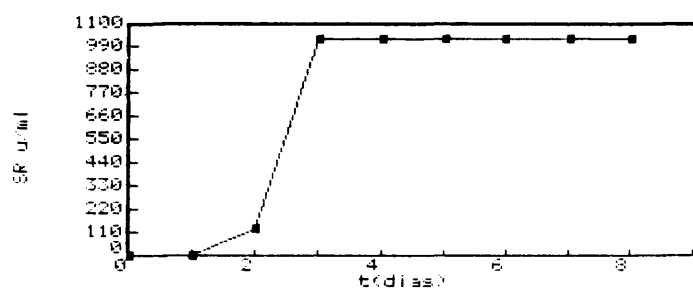


Figura 188. Producción de SR por PsF en Caldo de Patata y Glucosa (Difco).

En Caldo de Patata y Glucosa (Natural) (Figura 189).

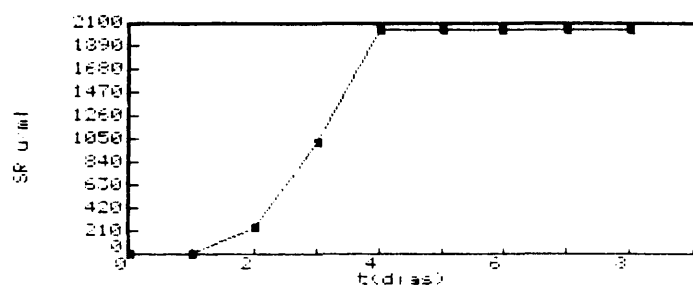


Figura 189. Producción de SR por PsF en Caldo de Patata y Glucosa Natural.

En Medio de Glucosa y Peptona (Figura 190).

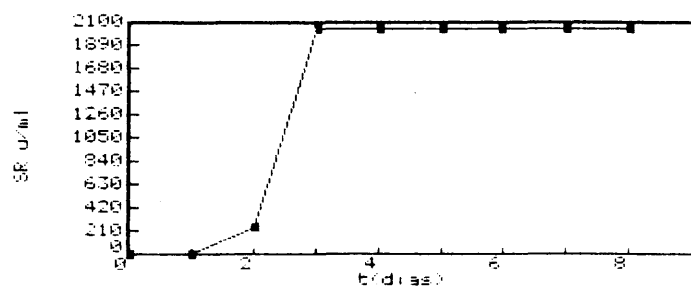


Figura 190. Producción de SR por PsF en Medio de Glucosa y Peptona.

En Medio de Glucosa y Triptona (Figura 191).

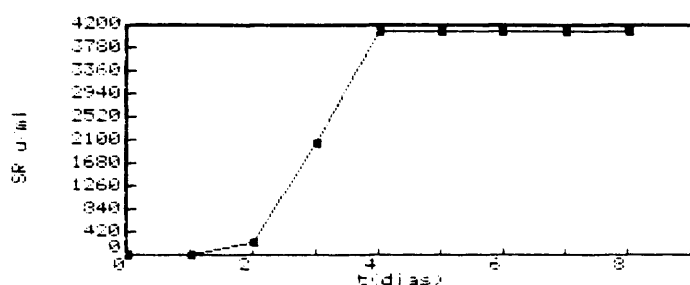


Figura 191. Producción de SR por PsF en Medio de Glucosa y Triptona.

Como primeras deducciones acerca de la producción de fitotoxina, podemos decir que entre todos los medios de cultivo, destaca especialmente el Medio de Glucosa y Triptona como el que dá un mayor rendimiento. En cuanto a las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi*, destaca la procedente *Fraxinus excelsior* (Ps F) como productora de mayor cantidad de fitotoxina, así como en la más rápida producción.

7.4. Producción de fitotoxina en los tejidos infectados.

Con el método ya descrito en III.10.2.1. llegamos al aislamiento de SR a partir de tumores inducidos por *P. syringae* pv. *savastanoi* en *Olea europaea*, *Fraxinus excelsior*, *Nerium oleander* y *Retama sphaerocarpa*. En todos los casos los resultados fueron positivos, aunque no se hizo ninguna

valoración cuantitativa.

Las pruebas de actividad las realizamos no sólo con *G. candidum*, sino también frente a *Candida albicans*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, dando en todos los casos resultado positivo, lo que venía a corroborar el amplio espectro de actividad de la fitotoxina. En la Figura 192 podemos ver la actividad antibiótica de la Siringomicina obtenida de tumores de las cuatro plantas citadas. En la fotografía superior izquierda vemos las acciones de la fitotoxina procedente de tumores de *Olea europaea* (A) y la de *Nerium oleander* (B) sobre *G. candidum* en Agar Mueller Hinton. En la fotografía superior derecha vemos las acciones de las mismas fitotoxinas sobre *Candida albicans* en Agar Mueller Hinton, siendo en este caso el halo de inhibición inferior. En la fotografía inferior izquierda vemos las acciones de las fitotoxinas (A de *Olea europaea*, B de *Nerium oleander*, C de *Fraxinus excelsior* y D de *Retama sphaerocarpa*) sobre *E. coli* en Agar Mueller Hinton. Y en la fotografía inferior derecha, tenemos las acciones de las mismas fitotoxinas sobre *Staphylococcus aureus* en el mismo medio de cultivo. Los halos de inhibición frente a las dos bacterias son superiores a los obtenidos frente a las dos levaduras.

La liberación de fitotoxina en los tejidos infectados contribuiría a la necrosis que se produce en los alrededores del canal de infección, e iría facilitando la extensión de la colonia bacteriana.

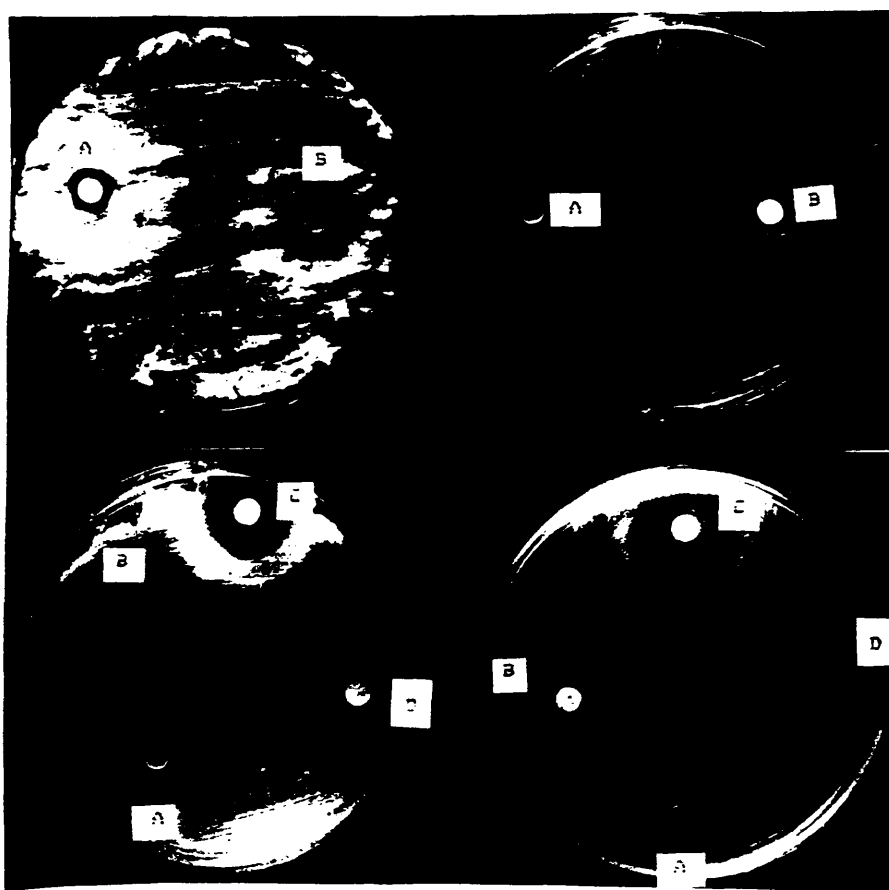


Figura 192. Actividad antibiótica de las Siringomicina obtenida de tumores de *Olea europaea*, *Nerium oleander*, *Fraxinus excelsior*, y *Retama sphaerocarpa*, sobre *G. candidum*, *Candida albicans*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*.

V. DISCUSION



V. DISCUSION.

1. SOBRE LA FLORA BACTERIANA PRESENTE EN LOS TUMORES.

Como hemos demostrado en IV.1., a pesar de que *P. syringae* pv. *savastanoi* es el agente etiológico de la tuberculosis del olivo, este microorganismo raramente aparece sólo en las formaciones tumorales (sólo de un 5 a un 10% de los casos, según nuestros resultados). En el resto de los tumores, junto con *P. syringae* pv. *savastanoi*, aparecen otros microorganismos que hemos podido clasificar como *Enterobacteriaceae*.

Situaciones similares nos hemos encontrado en las otras plantas afectadas de forma natural por *P. syringae* pv. *savastanoi* (*Nerium oleander*, *Fraxinus excelsior* y *Retama sphaerocarpa*).

Por las pruebas de patogeneidad realizadas por inoculación en la planta correspondiente y la posterior recuperación en cultivo del microorganismo inoculado, hemos podido comprobar que, en la naturaleza, la incorporación de las *Enterobacteriaceae* a los tumores se efectúa a posteriori.

También hemos podido constatar que no es necesaria la presencia de *Enterobacteriaceae* para el desarrollo del tumor, puesto que se encuentran tumores en los que no se detectan dichas bacterias y porque ellas por sí solas no inducen ninguna formación tumoral en ninguna de las plantas probadas, ni las que infecta naturalmente *P. syringae* pv. *savastanoi*, ni las que hemos utilizado en condiciones de laboratorio (*Phaseolus*

vulgaris y *Lycopersicon esculentum*). En estas últimas plantas, cuando hacíamos la inoculación con *P. syringae* pv. *savastanoi* y, al cabo de cierto tiempo, una vez desarrollado el tumor, tratábamos de recuperar la flora tumoral, nos encontrábamos exclusivamente *P. syringae* pv. *savastanoi* y nunca las *Enterobacteriaceae*. Como estas inoculaciones las hacíamos en condiciones de laboratorio, lógicamente las plantas no eran colonizadas por la misma flora epifita que aparece normalmente en la naturaleza, entre las que estarían las *Enterobacteriaceae* adaptadas a colonizar el tejido tumoral.

Podía pensarse en la existencia de algún tipo de simbiosis entre *P. syringae* pv. *savastanoi* y las *Enterobacteriaceae*, puesto que ambas bacterias aparecen juntas en varias circunstancias:

- En la flora tumoral.
- Como epifitas en las plantas infectadas por *P. syringae* pv. *savastanoi*.
- En la flora de los diversos estados de *Dacus oleae*.

No obstante, no hemos encontrado ninguna prueba de que dicha asociación exista ya que ambas bacterias crecen perfectamente tanto en medios artificiales como en la naturaleza, ya sea juntas o por separado.

Por tanto podíamos concluir que, más que algún tipo de simbiosis, el hecho de que aparezcan juntos estos microorganismos se debe a que comparten el mismo habitat y están adaptados a colonizar las mismas plantas.

2. LA VARIABILIDAD DE *P. SYRINGAE* PV. *SAVASTANOI*.

Desde los primeros tiempos de la historia de la enfermedad (Smith 1920) se sabía ya que esta ocurría, además de en *Olea europaea*, en *Fraxinus excelsior* y en *Nerium oleander*. No obstante, a pesar de repetidas inoculaciones, no conseguían reproducir la enfermedad en una planta con bacterias procedentes de otra. Por ello, a pesar de las características en común que tenían todos los microorganismos, les dieron nombres diferentes. Así tenemos la denominación de *Pseudomonas tonelliana* dada por Ferraris (1926) a la bacteria que produce la enfermedad en *Nerium oleander*. Desde entonces, a medida que se ha ido profundizando en el conocimiento de estos microorganismos, ha habido una tendencia a la unificación de la nomenclatura que culminó en el "Bergey's Manual" (8ª Edición. 1974) con la única denominación de *Pseudomonas syringae*. Con la salida del nuevo "Bergey's Manual" (1984) y siguiendo las recomendaciones de Dye et al. (1980), se reconocen 41 variedades patológicas, quedando finalmente la que estamos estudiando como *P. syringae* pv. *savastanoi*, independientemente de que se trate de patógena de *Olea europaea*, *Nerium oleander*, o *Fraxinus excelsior*. Debido a esto, todavía surgen autores, como el caso de Janse (1981 a, 1981 b, 1982), que propone una nueva nomenclatura para estos microorganismos. El nombre nuevo que propone Janse es *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* para la cepa tipo ATCC 13522 (= NCPPB 639), haciendo la división de variedades patológicas de la siguiente manera: pv. *oleae* para la que causa la enfermedad en *Olea europaea*, pv. *nerii* (de *Nerium*

oleander) y pv. *fraxini* (de *Fraxinus excelsior*).

Nosotros, al igual que Janse nos basamos en las características bioquímicas, serológicas y patológicas, por ello se puede decir que llegamos a conclusiones similares.

Entre todas las bacterias estudiadas, consideradas actualmente *P. syringae* pv. *savastanoi* por el "Bergey's Manual" (1984), incluyendo el nuevo aislamiento procedente de *Retama sphaerocarpa*, nos encontramos una analogía del 81.25% de los caracteres estudiados. Si hacemos apartados entre los microorganismos según la planta de la que han sido aislados nos encontramos los resultados que exponemos en los siguientes puntos.

2.1. Variabilidad de cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* procedentes de *Olea europaea*.

Entre todas las bacterias obtenidas de *Olea europaea*, incluyendo *O. europaea* var *sylvestris*, procedentes de las diferentes localizaciones geográficas estudiadas, nos encontramos un % de analogía del 85.93. Si consideramos solamente este grupo de cepas, entre ellas nos encontramos diferencias menores según donde hayan sido obtenidas y mucho menores si proceden del mismo lugar. Así entre la mayoría de las cepas de olivo de la Raña de la Mascara y la IF 3026, procedente de Benidorm, nos encontramos una analogía del 92.18%. Si comparamos entre sí todas las cepas procedentes de la comarca de Navahermosa, tanto si proceden de tumores, como de *Dacus oleae*, de acebuche u obtenidas de la flora epifítica, obtenemos unas analogías del 96.87%. Las diferencias que se dan

entre las bacterias de esta zona están a nivel de la asimilación de unas pocas fuentes de carbono, como arabinosa, caprato y citrato, y del patrón de sensibilidad-resistencia a Sulfadiazina (SD) y a la asociación Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT). En el caso de estos antibióticos nos hemos encontrado algún resultado anómalo, como la existencia de cepas sensibles a SD y resistentes a SXT. Es raro que un microorganismo sensible a las sulfamidas no sea sensible también a la asociación de una sulfamida con Trimetoprim. Es probable que las enzimas implicadas en la síntesis del ácido fólico sean sensibles a las sulfamidas y el hecho de la resistencia a SXT se explique por la existencia de una barrera de permeabilidad hacia el Sulfametoxazol o hacia ambos componentes de la asociación. Este resultado, por su rareza, lo hemos revisado varias veces, no sólo en la misma cepa que lo daba, sino que lo hemos vuelto a comprobar repetidamente en cepas procedentes de *Fraxinus excelsior* y *Nerium oleander*. (Figura 193).

En cuanto a la resistencia a los β -lactámidos, podemos decir que es general, puesto que todas las cepas estudiadas la cumplen. La única excepción sería la primera cepa de *P. syringae* pv. *savastanoi* aislada para este trabajo, a la que hemos denominado Ps 1. Cuando hicimos los primeros estudios de las características de este microorganismo, era resistente a estos antibióticos, sin embargo, hoy día, al cabo de diez años de permanencia en el laboratorio, hemos podido comprobar la pérdida de la resistencia. (Figura 194).

Esta nueva sensibilidad puede ser interpretada como la

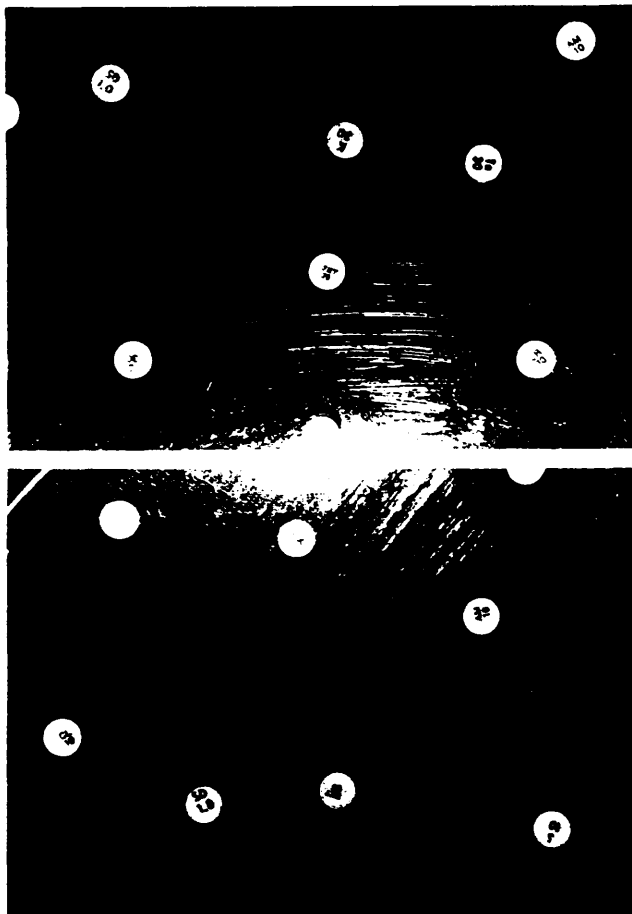


Figura 193. Arriba: *P. syringae* procedente de olivo sensible a SD y a SXT. Abajo: Cepa procedente de fresno sensible a SD y resistente a SXT.

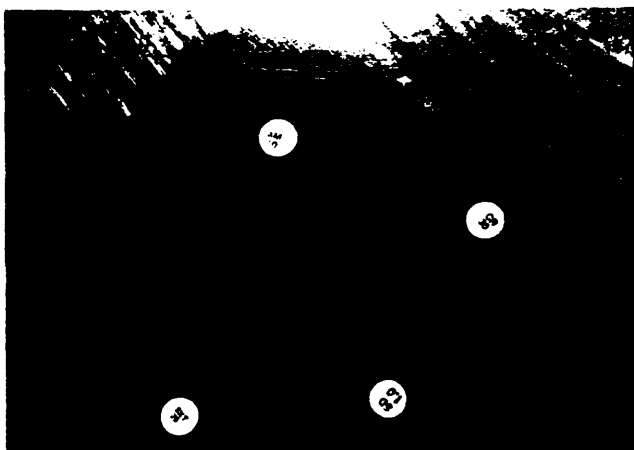


Figura 194. *P. syringae* pv. *savastanoi* (Ps 1) sensible a AM y CR consecuencia de la pérdida de un plásmido.

Cuando exponíamos en IV.1.3. el cuadro de la variabilidad de *P. syringae*, especificábamos aquellas cepas que habían sido obtenidas en Medio D4, ya que las pocas bacterias que crecían en este medio no parecían ser un bajo % de las presentes en cada tumor, sino que sólo crecían las procedentes de determinados tumores. Este hecho podía parecer, a primera vista un caracter sometido a variación y que podía estar ligado a otras características fenotípicas. Tras el estudio de los resultados podemos decir que no hemos encontrado ninguna relación entre el crecimiento en Medio D4 y cualquier otra característica fenotípica.

En cuanto a la comparación que podemos hacer entre las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* de olivo pero procedentes de

diversas localizaciones geográficas, podemos decir que también existen diferencias, principalmente a nivel de asimilación de fuentes de carbono. Así nos encontramos que mientras que las cepas procedentes de la Raña de la Mascara no asimilan manitol, sorbitol y manosa, las obtenidas en Villaviciosa de Odón, Méntrida y Montepríncipe se comportan al contrario. Lo mismo podemos decir de la asimilación de sacarosa, positiva para las cepas de la Raña de la Mascara, Río Cedená, Méntrida y Montepríncipe, y negativa para las de Benidorm y Villaviciosa de Odón.

El patrón de resistencia-sensibilidad ante SD y SXT es uniforme en todas las cepas de las distintas localizaciones (Sensibles a SD y resistentes a SXT), a excepción de las de la Raña de la Mascara, como ya hemos comentado.

2.2. Variabilidad de cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* procedentes de otras plantas.

Comparando las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* procedentes de *Olea europaea* con las de *Nerium oleander*, y si atendemos sólo al carácter absoluto del signo positivo o negativo, no encontraremos más diferencias que las que se puedan detectar entre todas las cepas de olivo. Así, la analogía entre la mayoría de las cepas de la Raña de la Mascara y las cepas de adelfa de Arturo Soria es de un 92.18%, la misma que detectábamos entre todas las cepas de olivo de distintas comarcas. La diferencia entre las cepas de olivo y las de adelfa la podemos constatar cuando controlamos el tiempo en el

que han transcurrido las reacciones efectuadas. Por ejemplo, cuando en las cepas de olivo ARA, CAP y CIT dan reacción positiva, lo hacen a las 72 horas, a excepción de IF 3026 que da positiva a las 48 horas, mientras que en las cepas de adelfa estas reacciones son ya notables a las 48 horas y algunas como el CIT es visible ya a las 24 horas (Figura 195).

Fuera de todas las pruebas de laboratorio efectuadas, está claro que la principal diferencia entre las cepas de olivo y adelfa es la especificidad por el huesped.

Comparando las cepas de adelfa procedentes de distintas zonas de la provincia de Madrid nos encontramos que tienen en común el 93.75% de los caracteres probados, estando las variaciones a nivel de asimilación de fuentes de carbono y de sensibilidad-resistencia a SD y SXT, como en el caso de las cepas obtenidas de olivo.

Cuando descubrimos por vez primera los tumores en *Retama sphaerocarpa*, las plantas afectadas se encontraban en la zona del Río Cedená en la que abunda *Olea europaea* var. *sylvestris*, por lo que pensamos que la enfermedad del acebuche había podido ser transmitida a la retama por acción de algún vector. Ya en los primeros aislamientos que hicimos nos dimos cuenta que había diferencias en los caracteres de cultivo en los Medios B de King y Agar Nutritivo, siendo su crecimiento menor, con colonias más pequeñas, más lento (Figuras 44 y 45).

En el análisis de la variabilidad nos hemos encontrado una analogía del 92.18% entre las cepas de retama y las de acebuche del Río Cedená, y del 90.62 entre las cepas de retama y

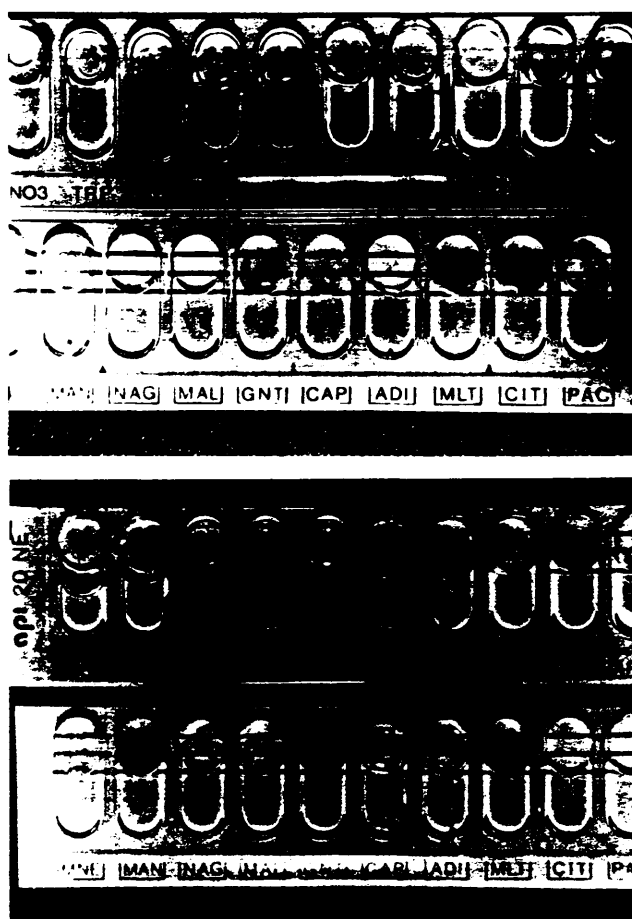


Figura 195. Pruebas API 20 NE, 48 horas de incubación. Arriba: Cepa procedente de adelfa, destacando CAP y CIT positivos. Abajo: cepas de olivo destacando las mismas pruebas aún negativas.

las de olivo de la Raña de la Mascara.

Entre las cepas de retama de diversas localizaciones geográficas detectamos también pequeñas diferencias, pero sólo a nivel de asimilación de fuentes de carbono.

Con las cepas procedentes de *Fraxinus excelsior* descubrimos situaciones parecidas a las descritas, siendo la analogía entre estas y las de olivo de la Raña de la Mascara de un 89.06%. Estas cepas también muestran diferencias en sus caracteres culturales, creciendo más rápidamente en todos los medios de cultivo habituales (Figuras 44 y 45), y son fácilmente diferenciables de las de olivo, retama o adelfa por su rápida y clara reacción positiva de hidrólisis de la esculina y la gelatina (Figura 196).

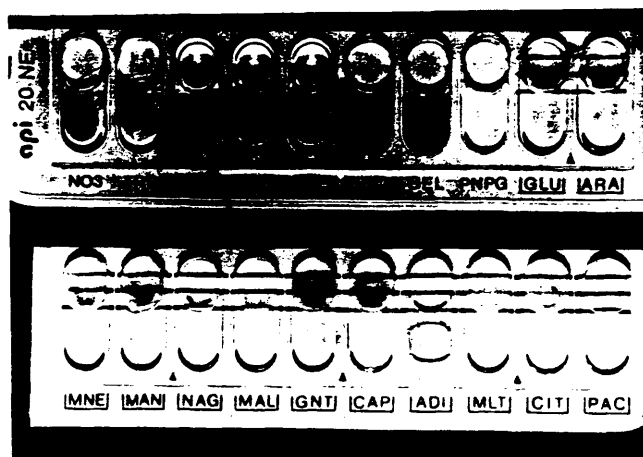


Figura 196. Pruebas API 20 NE de Ps F, destacando las reacciones positivas de los compartimentos ESC y GEL.

Entre las cepas procedentes de fresno no hemos encontrado variabilidad, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que los únicos ejemplares de *Fraxinus excelsior* infectados que hemos encontrado estaban todos en una pequeña extensión en la cuenca del Río Cedula.

3. VARIABILIDAD DE LAS ENTEROBACTERIACEAE PRESENTES EN LA FLORA TUMORAL.

En primer lugar aclararemos el porqué de la denominación de Enterobacteriaceae y no *Agrobacterium* como era su última denominación. Sirviéndonos como base todas las características estudiadas y dirigiéndonos al "Bergey's Manual" (1984), nos encontramos el género *Agrobacterium*, dentro de la familia Rhizobiaceae, definido como "no productor de nódulos en plantas leguminosas pero la mayoría de las especies producen otro tipo de hipertrofias (incontroladas e indiferenciadas) en muchas plantas" (Jordan 1984). Una vez en el género *Agrobacterium*, entre sus características tenemos el hecho de que son microorganismos aerobios, metabolismo respiratorio y, con la excepción de *A. radiobacter*, inducen la formación de tumores en plantas (Kesters y De Ley. 1984). Sólo con estos caracteres ya podemos rechazar claramente la denominación de *Agrobacterium*, porque las bacterias estudiadas son facultativas, metabolismo fermentativo y no inducen ningún tipo de hipertrofia en plantas.

Por el contrario, vemos que estas bacterias cumplen las características generales para la familia

Enterobacteriaceae: bacilos Gram-negativos, facultativos, metabolismo respiratorio y fermentativo, fermentadores de glucosa, catalasa + y oxidasa -. Y dentro de la familia **Enterobacteriaceae**, dirigiéndonos a las características de los géneros llegaríamos al género **Erwinia** que, además de cumplir los caracteres generales de la familia son bacterias con temperatura óptima de 27-30°C, fermentan glucosa con producción de ácido y no de gas, y se encuentran asociadas con plantas como patógenas, saprofitas, o como constituyentes de la flora epifítica (Lelliot y Dickey. 1984). En el género **Erwinia** hay actualmente quince especies clasificadas, de las cuales catorce son patógenas para diversas plantas, y **Erwinia herbicola**, una especie saprofita o epifita de una gran variedad de vegetales.

Si nos atenemos a esta última clasificación del "Bergey's Manual", tendríamos que clasificar a éstas bacterias como **Erwinia herbicola**, puesto que esta especie, a pesar de estar descrita con cepa tipo (NCPB 2971) y estar incluida en las Approved List de 1980, es una especie de cajón de sastre en la que se puede incluir cualquier bacteria epifita que cumpla los caracteres generales de **Erwinia** y no sea patógena. Comparando la cepa mas representativa de olivo de la Raña de la Mascara, la cepa amarilla que hemos llamado Ea con **Erwinia herbicola** en las características de cultivo, fisiológicas, bioquímicas y asimilación de fuentes de carbono que figuran en el "Bergey's Manual" (1984), nos encontramos que difieren en 10 de 27 caracteres considerados. Si a esta misma bacteria la comparásemos con **Erwinia carotovora** nos encontraríamos con una

diferencia en 9 de 27 caracteres.

Aplicando exclusivamente el método API 20 E, vemos que *Ea* y *Erwinia carotovora* (var. *carotovora* y var. *atroseptica*) dan los mismos resultados (Figura 197) qué, consultando el Analytical Profile Index API 20 E, nos llevan a la identificación de *Enterobacter agglomerans*, o bien la posibilidad de *Erwinia* spp. Las especies de *Erwinia*, según este método, serían *E. carotovora*, *E. cypripedii*, *E. nigrifluens* o *E. rhapontici*. En este caso la identificación se aproxima algo a la realidad, lo que no ocurre con las cepas blancas (Figura 198), como Eb, para las que este método nos lleva a la identificación de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, que no tiene nada que ver con las bacterias que estamos estudiando. De aquí podemos concluir un hecho que ya teníamos claro al aplicar el método API, y es que sólo nos iba a servir para poder obtener una buena cantidad de información sobre un microorganismo con una sólo incubación, y no para hacer la identificación real de la bacteria. Ello se debe a que este método, como otros similares existentes en el mercado, están destinados a cubrir las necesidades habituales de identificación en un laboratorio de Microbiología Clínica, que requiere sistemas rápidos, pero no son métodos que se puedan aplicar indiscriminadamente a la identificación de cualquier bacteria.

Comparando las cepas de *Enterobacteriaceae* procedentes de olivo con las obtenidas de otras plantas nos encontramos desde unas analogías casi totales, cosa que ocurre con cepas amarillas de retama que pueden diferir sólo a nivel serológico



Figura 197. Aplicación del método API 20 E a la comparación de bacterias. A: *Agrobacterium tumefaciens* V. B: *Erwinia carotovora*. C: Ea. Nota: los resultados de AMY y ARA en A e INO en B y C son realmente negativos, con color verde, pero la foto destaca mas un tono amarillento.

y de asimilación de citrato (Figura 199) hasta diferencias en asimilación de unas fuentes de carbono, Voges-Proskauer o reducción de nitratos.

Todas las bacterias presentadas en el cuadro del apartado IV. 1.4., a excepción de E 58, E 59, E 74 y E 75, procedentes las dos primeras de tumor de adelfa y las otras dos de tumor de fresno, que no son *Enterobacteriaceae* por no fermentar la glucosa, pueden ser consideradas, según la actual clasificación del "Bergey's Manual" (1984), como pertenecientes al género *Erwinia*.

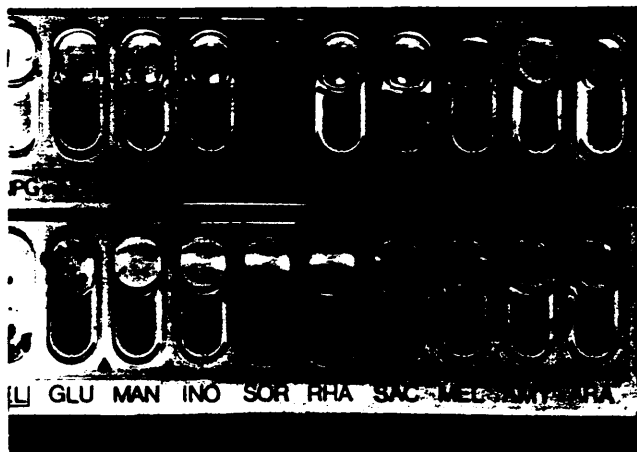


Figura 198. Reacciones API 20 E producidas por la cepa Eb.

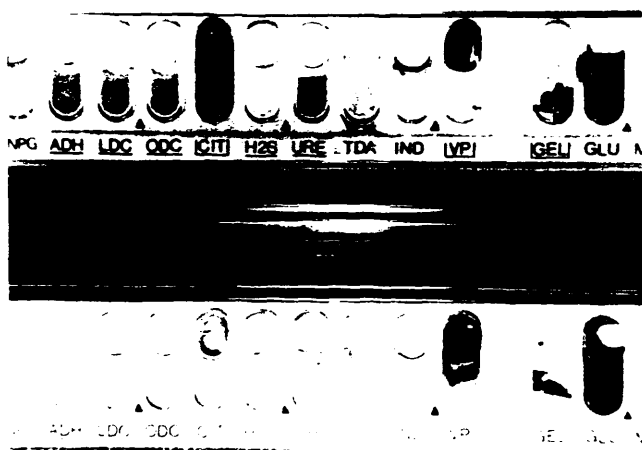


Figura 199. Pruebas básicas de identificación API 20 E de Enterobacteriaceae procedentes de olivo (arriba) y de retama (abajo).

4. VARIACIONES NUMERICAS DE LA FLORA EPIFITICA.

Los recuentos de microorganismos hechos a lo largo de los cuatro últimos años, en la Raña de la Mascara, tanto los totales como los de *P. syringae*, siguen todos una evolución muy similar en sus variaciones estacionales. Según vimos en IV. 5. hay dos momentos en cada año, coincidiendo con el inicio de las lluvias primaverales y otoñales, en los que se dispara el crecimiento de microorganismos. Ya Hirano (1985) demostraba como la lluvia potenciaba el rápido crecimiento de los microorganismos sobre las hojas, registrando incrementos de población media de 30 a 150 veces en 24 horas. Además de

considerar el hecho del crecimiento normal de la flora epifítica en favorables condiciones climatológicas, hay que tener en cuenta también la salida en masa hacia la superficie de microorganismos de la flora tumoral, coincidiendo con las lluvias citadas, que contribuyen notablemente a incrementar los números totales.

Como hemos podido comprobar, no es sólo el incremento de las precipitaciones lo que hace crecer la población microbiana, sino también la coincidencia con un momento en que la temperatura ambiente media coincide con la temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los microorganismos de la flora epifítica. Este hecho se pone de manifiesto en las Figuras 200, 201, 202 y 203. en las que vemos la relación existente entre los números totales de microorganismos, la temperatura media y las precipitaciones.

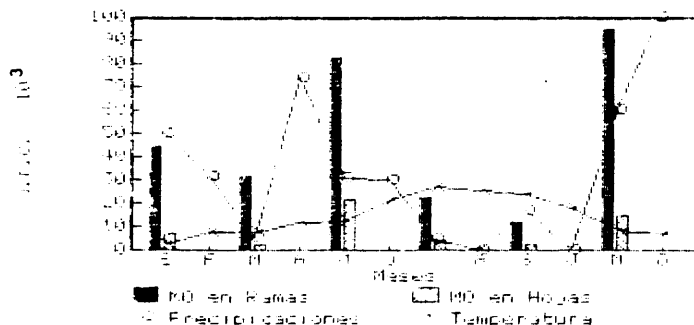


Figura 200. Relación entre los recuentos de microorganismos totales, temperaturas y precipitaciones . Año 1985.

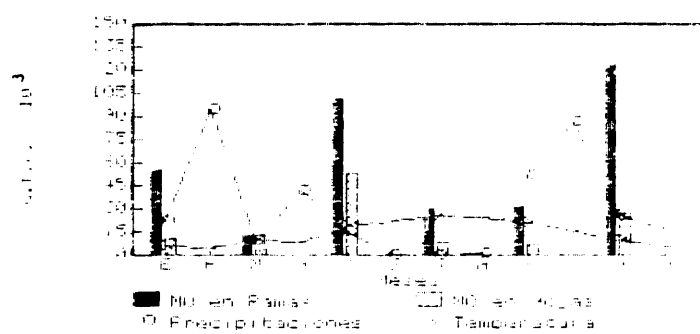


Figura 201. Relación entre los recuentos de microorganismos totales, temperaturas y precipitaciones. Año 1986.

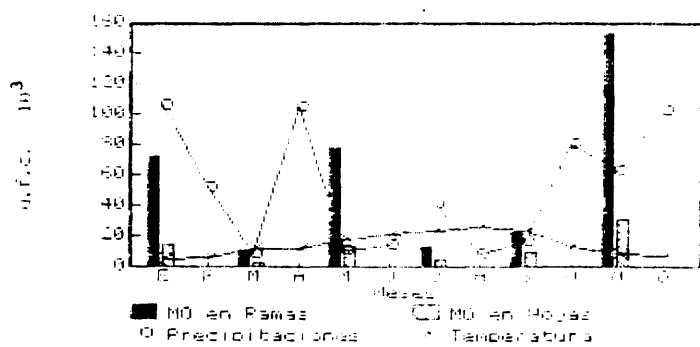


Figura 202. Relación entre los recuentos de microorganismos totales, temperaturas y precipitaciones. Año 1987.

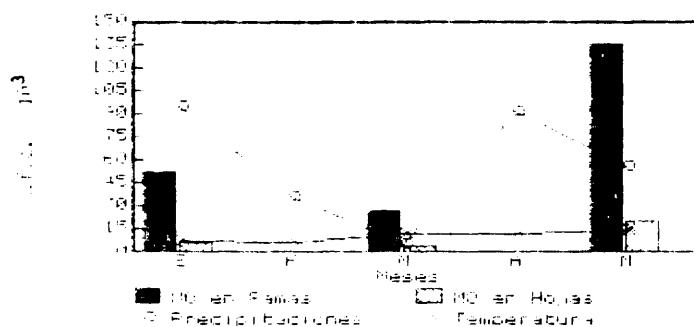


Figura 203. Relación entre los recuentos de microorganismos totales, temperaturas y precipitaciones. Año 1988.

En todos los casos vemos que la densidad de población microbiana aparece siempre más alta en las ramas que en las hojas. Este hecho lo podríamos explicar por el efecto que produce la luz sobre los microorganismos. Ya Smith (1920) demostró que la luz solar inhibía el crecimiento de su *Bacterium savastanoi*. Este no es un caso aislado, puesto que hay otros microorganismos que sufren el proceso que se ha denominado fotooxidación, mediante el cual la luz absorbida por la célula ocasiona la inactivación de enzimas o de otros componentes sensibles cuando hay oxígeno en el medio (Mathews et al. 1959, citados por Brock 1973). Esta generalización que acabamos de hacer sobre el mayor número de microorganismos en hojas que en ramas tiene una excepción en el caso de la flora epifítica de

la variedad Manzanilla en el presente año, donde nos encontramos la relación invertida para *P. syringae* pv. *savastanoi* (Figura 70). Al tratarse de unos recuentos únicos, realizados sólo durante los meses de enero, marzo y mayo de 1988, sin contrastar con otros similares de varios años, no podemos generalizar nada pero, de confirmarse este hecho, podía ser un punto de partida para la investigación de las razones de porqué esta variedad es más resistente a la tuberculosis del olivo.

5. AGENTES DE TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD.

5.1. Relación con la mosca del olivo.

El hecho de que hayamos corroborado la existencia de *P. syringae* pv. *savastanoi* en todas las etapas del desarrollo de *Dacus oleae* no significa que la mosca del olivo pueda ser un vector de la tuberculosis del olivo. Para que *Dacus oleae* actúe como vector es necesario, no sólo que porte al agente etiológico, sino que facilite de alguna manera su penetración y, como hemos visto en la Introducción, la única herida que es capaz de hacer la mosca a la planta es en el fruto durante la puesta, no resultando éste afectado por la enfermedad.

Por tanto, no hay suficientes pruebas para considerar a *Dacus oleae* como transmisor de la tuberculosis del olivo, y debemos pensar que las relaciones de la mosca con *P. syringae* pv. *savastanoi* son fruto de una evolución normal desde el punto de vista ecológico en el habitat que comparten.

5.2. Relación con la recolección.

Tanto la obtención de cultivos y las observaciones microscópicas a partir de las varas empleadas en la recolección como las observaciones de campo (IV. 3.1. y IV 3.2.) nos han llevado a concluir que el proceso de recolección, tal y como se lleva a cabo actualmente, es el principal agente transmisor de la tuberculosis del olivo.

Tras la recolección y, sobre todo, cuando esta se realiza en momentos de lluvia o rocío, es cuando se desencadenan los ataques más importantes de la enfermedad, debido a las heridas que se infieren a la planta con el vareo junto con el aporte de bacterias que lleva la vara al golpear, principalmente, los tumores que ya existían.

5.3. Relación con las heladas.

Como hemos demostrado, todas las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* ensayadas han resultado ser INA + . Este hecho, junto con las observaciones de los olivareros, ingenieros agrónomos (Mateo Sagasta 1975) y las nuestras propias nos lleva a pensar que probablemente la formación de núcleos de hielo por las bacterias sea un mecanismo de penetración natural, adquirido a lo largo de la evolución. Ello nos explicaría la aparición de nuevos tumores, aunque escasos, en olivares no cultivados, en olivos aislados con función ornamental, o en plantas no cultivadas como *Fraxinus excelsior*, *Nerium oleander* y *Retama sphaerocarpa*.

6. CITOLOGIA E HISTOLOGIA DE LOS TUMORES.

De las observaciones microscópicas realizadas a partir de tumores naturales en ramas y hojas de olivo podemos concluir que todos los tejidos de la planta pueden verse afectados por la acción de la bacteria, ya que nos hemos encontrado en la masa tumoral todo tipo de células desorganizadas: parénquima, elementos vasculares, elementos de sostén, súber, etc. No obstante, la mayor parte del tumor está formada por células parenquimáticas como las vistas en la Figura 84, muy parecidas en tamaño, estructura y composición a las del parénquima medular, pero con una forma mucho más variable y menos regular.

En *Retama sphaerocarpa* las características de los tumores son similares a las descritas para *Olea europaea*, a pesar de las diferencias taxonómicas y anatómicas de ambas plantas.

Finalmente, hemos confirmado la localización siempre extracelular del patógeno en todas las plantas estudiadas.

7. PRODUCCION DE AIA.

Como hemos empleados dos métodos para estudiar la producción de AIA: el método colorimétrico de Gordon y Weber (1951) y la cromatografía líquida (HPLC), en primer lugar vamos a establecer si ambas son válidas y en qué condiciones debemos utilizarlas.

7.1. Evaluación de métodos.

El método colorimétrico de Gordon y Weber es

susceptible de ser empleado siempre que se trate de cultivos grandes sometidos a agitación en los que se trate de detectar cantidades del orden de μg . Por debajo de ese nivel los resultados no serían fiables.

Las técnicas de HPLC, por el contrario nos permiten la detección de AIA a nivel de ng ., como hemos podido comprobar, y esto teniendo en cuenta que la detección la hemos realizado en mezclas muy complejas, como son los medios de cultivo, porque si tratásemos de detectar AIA puro, el nivel de sensibilidad lo podríamos rebajar hasta pg .

En cuanto a la elección de medios de cultivo, también depende de qué objetivo se pretenda. Hemos visto como en todos los medios empleados se puede detectar AIA. En el Medio de Glucosa y Triptona es en que se producen las mayores concentraciones del metabolito. Si lo que se quiere es sólo saber si hay producción o no, se puede utilizar perfectamente un simple Caldo Nutritivo por ser más barato y de más fácil y rápida preparación.

7.2. Cinética de la producción de AIA.

En la mayor parte de los casos hemos visto como la producción de AIA comienza inmediatamente, incrementándose en el tiempo de incubación hasta aproximadamente los 6 ó 7 días, sufriendo posteriormente una caída, debido probablemente al fin del crecimiento en el cultivo estático y a la degradación del AIA.

La comparación de la producción máxima de AIA en g/ml según los métodos descritos en III.2.9.2. la podemos ver en el

siguiente cuadro:

	<u>C. N.</u>	<u>Patata G(D)</u>	<u>Patata G(N)</u>	<u>Glucosa Pep.</u>	<u>Glucosa Trip.</u>
Ps 1	2.1	1.2	0.6	1.8	7.5
Ps 2	1.9	0.8	1.9	1.6	6.7
Ps 3	2.0	1.3	2.0	2.0	6.1
Ps 4	2.2	1.5	2.1	2.3	2.1
IF3026	1.9	2.2	0.5	2.0	3.8
Ps R	1.9	2.0	2.6	2.9	2.7
Ps A	0.8	0.7	1.7	1.0	4.8
Ps F	1.4	1.0	1.9	1.1	2.3

Destacamos la mayor producción de AIA por parte de las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* procedentes de *Olea europaea* y, en el extremo contrario con la más baja producción por parte de la cepa obtenida de *Nerium oleander*. Esta baja producción por parte de Ps A puede que tenga relación con la conversión de AIA en AIA-lisina (Hutzinger y Kosuge, 1986) por parte de las cepas procedentes de adelfa, cosa que no ocurre en las cepas obtenidas de olivo.

8. PRODUCCION DE SIRINGOMICINA.

El problema que nos hemos encontrado a la hora de evaluar la producción de SR es la inexactitud del método de Sinden et al. (1971), no sólo por el hecho de basarse en la investigación de actividad antibiótica de diluciones doble progresivas, sino también por la propia definición de unidad de

actividad de SR: la dilución que inhibe completamente el crecimiento de *G. candidum* en el área de aplicación de los 10 l. Al no estar definido en tiempo de incubación, la definición se convierte en inexacta porque, como se puede apreciar en la Figura 204, el halo de inhibición que produce la SR no es estático, sino que se incrementa hasta los 4 días manteniendo los bordes nítidos y, a partir de ese momento, se difunde por toda la placa. Por esta razón nosotros nos hemos inclinado por la incubación durante 4 días para determinar la actividad antibiótica.



Figura 204. Evolución de los halos de inhibición producidos por 10 μ l. de una fracción de SR a las 24, 48 y 96 horas de incubación.

La producción de SR, a diferencia de lo que ocurre con el AIA, no comienza desde los primeros momentos del cultivo

sino a los 2 ó 3 días, según la tasa de crecimiento de cada cepa. El máximo de producción se alcanza de los 4 a 6 días de incubación, coincidiendo también con el alcance de la fase estacionaria, como ocurre con la producción de otros antibióticos de origen microbiano. Este máximo, una vez alcanzado, se mantiene, lo que denota la mayor estabilidad de la SR, no siendo degradado el metabolito, a diferencia de lo que sucede con el AIA.

Como ejemplo de la cinética de la producción de SR, vemos en la Figura 205 un gráfico en el que se compara dicha producción con la curva de crecimiento.

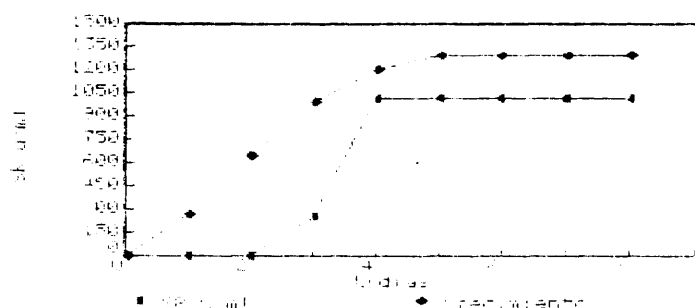


Figura 205. Producción de SR por Ps A en el Medio de Glucosa y Peptona, comparada con la curva de crecimiento en el mismo medio.

Como vemos en este ejemplo, que puede ser representativo de todos los casos, la producción de SR se debe

desencadenar durante la fase exponencial, deteniéndose al llegar a la fase estacionaria.

Finalmente destaquemos que la aplicación de técnicas de HPLC a la producción de SR sólo la hemos empleado para comprobar la mayor o menor pureza de las fracciones, no al análisis cuantitativo. Para poder llevar a cabo esta aplicación sería necesario la purificación total de SR empleando columnas preparativas de cambio iónico para poder cuantificar en medidas de peso.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. Las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* procedentes de *Olea europaea* presentan variaciones fenotípicas principalmente a nivel de asimilación de diferentes fuentes de carbono. Estas variaciones son pequeñas entre cepas de la misma comarca y se acentúan entre cepas de comarcas alejadas geográficamente.

2. Se describe la enfermedad tumoral en *Retama sphaerocarpa* producida por un microorganismo que hemos caracterizado como *P. syringae* pv. *savastanoi*.

3. Las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* procedentes de las distintas plantas estudiadas muestran diferencias fenotípicas de hasta un 18.75%, encontrándose también pequeñas variaciones entre cepas de la misma planta y entre las obtenidas de diferentes localizaciones geográficas. Las variaciones fenotípicas son, principalmente, en la asimilación de fuentes de carbono.

4. Las bacterias que aparecen junto con *P. syringae* pv. *savastanoi* en la flora tumoral, asociadas a *Dacus oleae* y como epifitas, han sido determinadas como pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y, mas concretamente, como género *Erwinia*, rechazando la última denominación de *Agrobacterium luteum*. Estas bacterias no participan en el desencadenamiento de la enfermedad pero están adaptadas a colonizar el tejido tumoral. Siguiendo el

"Bergey's Manual" (1984) deberíamos considerarlas como *Erwinia herbicola*, la única especie no patógena del género, pero pensamos que sería una idea demasiado simple dada la especificidad que muestran en su asociación a los tumores.

5. Las variaciones numéricas de la población microbiana epifítica están en relación con las condiciones climatológicas de temperatura y humedad, alcanzándose los números máximos en dos ocasiones anualmente, cuando estas condiciones facilitan el crecimiento de los microorganismos.

6. La mosca del olivo, *Dacus oleae*, no es un vector de transmisión de la tuberculosis del olivo, a pesar de haberse demostrado la presencia de *P. syringae* pv. *savastanoi* en todos los estados de desarrollo de la mosca.

7. El vareo durante la recolección de la aceituna es el principal agente de transmisión de la tuberculosis del olivo.

8. Todas las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* ensayadas resultaron ser formadoras de núcleos de hielo, hecho que podría ser considerado como una adquisición evolutiva de las bacterias para su penetración en la planta en condiciones naturales.

9. Todos los tejidos de *Olea europaea* se ven afectados por el desarrollo del tumor, aunque la masa principal de éste

se encuentra constituida por células parenquimáticas similares en tamaño y estructura a las del parénquima medular, aunque de forma más irregular.

10. En *Retama sphaerocarpa*, en la que la enfermedad, el agente etiológico y la histología tumoral son descritos por vez primera en esta tesis, las características de los tumores son similares a las descritas para *Olea europaea*.

11. Hemos desarrollado un método de HPLC para la detección de AIA en los cultivos, sin necesidad de extracciones, que nos ha permitido estudiar la producción del metabolito desde los primeros momentos de la incubación.

12. Todas las cepas de *P. syringae* pv. *savastanoi* producen SR en cultivo artificial y en los tejidos de la planta infectada. Para la cuantificación de la actividad antibiótica hemos empleado el método de Sindén et al. (1971), que es una forma de valoración relativa e inexacta. Una vez que disponemos de los patrones y de las condiciones cromatográficas, sólo es necesaria la cromatografía preparativa para poder realizar una determinación cuantitativa en cada caso.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Allen, O.N. y Holding, A.J. 1.974
Genus II. *Agrobacterium*. En Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. Ed. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a Ed. 267.
- 2) Andrés Cantero, F. de. 1965
Enfermedades y plagas del olivo.
Dirección General de Agricultura. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- 3) Arambourg, Y. 1971.
Algunas características biológicas de *Dacus oleae*.
Conferencia Internacional de Técnicas Oleícolas.
Torremolinos. España: 14-19. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- 4) Arambourg, Y. 1975.
Insectos perjudiciales al olivo.
II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba. Vol. I.
Ponencias: 118-127. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- 5) Arroyo Varela, M. 1964.
La mosca de la aceituna.
Publicaciones de capacitación agraria. Hojas
Divulgadoras número 12: 2-16. Ministerio de Agricultura. Madrid.

- 6) Baca, S.M., Canfield, M.L. y Moore, L.W. 1987.
Variability in ice nucleation strains of *Pseudomonas syringae* isolated from diseased woody plants in Pacific Northwest nurseries.
Plant Dis. 71: 412-415.
- 7) Backman, P.A. y De Vay, J.E. 1971.
Studies on the mode of action and biogenesis of the phytotoxin Syringomycin.
Physiol. Plant Pathol. 1: 215 - 233
- 8) Baker, J. H. 1981.
Direct observation and enumeration of microbes on plant surfaces by light microscopy. En Blakeman, J.P. Ed. Microbial Ecology of the Phylloplane: 3-14.
Academic Press. London.
- 9) Balázs, E. Sziráki, I y Király, Z. 1977.
The role of cytokinins in the systemic acquired resistance of tobacco hypersensitive to tobacco mosaic virus.
Physiol Plant Pathol. 11: 29-37.
- 10) Baratta, B y Di Marco, L 1981.
Controllo degli attacchi di "rogna" nella cultivar Nocellara del Belice.
Informatore Fitopatológico. 31: 115-116.
- 11) Bauer, A.W., Kirby, W. M.M., Sherris, J.C. y Turck, M. 1966.

Antibiotic susceptibility testing by a standardized simple disk method.

Amer. J. Clin Pathol. 45: 493-496.

- 12) Beltrá, R. 1959.

El ácido beta-indol acético y los tumores vegetales de origen bacteriano.

Revista Latinoam. Microbiol. 2: 23-32.

- 13) Benlloch, M. y Andrés, F. de 1972.

Clave sistemática para reconocer los agentes patógenos del olivo.

Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica. Ministerio de Agricultura. Madrid.

- 14) Berrio Moreno, T. 1976.

Cultivo del olivo y conducta de los insectos: 53.

Gráficas Nova S.A. Jaén.

- 15) Bidwai, A.P., Zhang, L., Bachmann, R.C. y Takemoto, J.Y. 1987 a.

Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, Syringomycin. Stimulation of red beet plasma membrane ATP-ase activity.

Plant Physiol. 83: 39-43.

- 16) Bidwai, A.P. y Takemoto, J. Y. 1987 b.

Bacterial phytotoxin Syringomycin stimulates a protein kinase mediated phosphorylation of red beet plasma membrane polypeptides.

J. Cell. Biochem. Suppl. 0. 11: 93.

- 17) Billing, E. y Baker, L.A.E. 1963.
Characteristics of *Erwinia*-like organisms found in
plant material.
J. Appl. Bacteriol. 26: 58-65.
- 18) Birkby, K. M., Preece, T.F. 1981.
Differentiation of gram positive and gram negative
bacteria in transparent acrylic resin emulsion
replicas of surfaces of plants.
J. Appl. Bacteriol. 50: 59-63.
- 19) Bobone, A. 1933. Essai sur la caractérisation des
variétés de l'olivier. Etude biométrique.
Actes du XI^{ème} Congrès d'Oleiculture: 87-146.
Lisbonne.
- 20) Bouden, R.L. y Percich, J.A. 1983.
Bacterial brown spot of wild rice, *Zizania aquatica*.
Plant Dis. 67: 941-943.
- 21) Brock, T.D. 1973.
Biología de los Microorganismos: 220-221.
Ed. Omega. Barcelona.
- 22) Buddenhagen, I. W. 1965.
The relation of plant-pathogenic bacteria to the soil.
En Baker, K. F. y Synder, W.C. Ed. Ecology of Soil-
borne Plant Pathogens: 269-284.

Univ. Calif. Press. Berkeley. U.S.A.

- 23) Buttiaux, R., Beerens, H., Tacquet, A. 1974.
Manuel de Techniques Bactériologiques.
Flammarion Médecine-Sciences. Paris.
- 24) Carles, L. 1985.
Quelques maladies de l'olivier provoquées par des
bactéries et des champignons.
Arboriculture Fruitière. 371: 54-55.
- 25) Ceballos, L y Ruiz de la Torre, J. 1979.
Arboles y Arbustos de la España Peninsular: 428-429.
E.T.S.I. de Montes. Sección de Publicaciones. Madrid.
- 26) Ciccicarese, F., Cirulli, M. y Surico, G. 1981.
Comportamento di varietà di olivo verso il freddo e la
"rogna" in Puglia e Lucania nel 1979.
Informatore Fitopatologico. 31: 107-113.
- 27) Cody, Y.S. y Gross, D.C. 1987 a.
Characterization of Pyoverdine pss, the fluorescent
siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv.
syringae.
Appl. Environ. Microbiol. 53: 928-934.
- 28) Cody, Y.S., Gross, D.C., Proebsting Jr., E. L. y
Spotts, R.A. 1987 b.
Suppression of ice nucleation-active *Pseudomonas*
syringae by antagonistic bacteria in fruit tree

orchards and evaluations of frost control.

Phytopathology. 77: 1036-1044.

- 29) Comai, L., Surico, G. y Kosuge, T. 1982.
Relation of plasmid DNA to Indoleacetic Acid
production in different strains of *Pseudomonas syringae*
pv. *savastanoi*.
J. Gen. Microbiol. 128: 2157-2163.
- 30) Comai, L. y Kosuge, T. 1980.
Involvement of plasmid Deoxyribonucleic Acid in
Indoleacetic Acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*.
J. Bacteriol. 143: 950-957.
- 31) Comai, L. y Kosuge, T. 1982.
Cloning and characterization of "iaaM", a virulence
determinant of *Pseudomonas savastanoi*.
J. Bacteriol. 149: 40-46.
- 32) Comai, L. y Kosuge, T. 1983.
The genetics of indoleacetic acid production and
virulence in *Pseudomonas savastanoi*. En Molecular
genetics of the bacteria-plant interaction: 362-366.
Springer - Verlag.
- 33) Comai, L. y Kosuge, T. 1983.
Transposable element that causes mutations in a plant
pathogenic *Pseudomonas* spp.
J. Bacteriol. 154: 1162-1167.

- 34) Crosse, J. E. 1959.
Bacterial canker of stone-fruits. IV. Investigation of
a method for measuring the inoculum potential of
cherry trees.
Ann. Appl. Biol. 47: 306-317.
- 35) Currier, T.C. y Morgan, M.K. 1983.
Plasmids of *Pseudomonas syringae*: No evidence of a
role in toxin production or pathogenicity.
Can. J. Microbiol. 29: 84-89.
- 36) Curtis, J. 1986.
Microtecnia vegetal.
Editorial Trillas. México D.F.
- 37) Daft, G.C. y Leben, C. 1972.
Bacterial blight of soybeans: seedling infection
during and after emergence.
Phytopathology. 62: 1167-1170.
- 38) Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. 1986.
Molecular Cell Biology: 707-710.
Scientific Amercian Books. Freeman Co. New York.
- 39) Dasch, G.A., Weiss E. y Kwang-Poo, C. 1984.
Endosymbionts of Insects. En Krieg, N.R. y Holt. J. G.
Ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1:
832-833.
- 40) De Vay, J.E., González, C.F. y Wakeman, R.J. 1978.

Comparison of the biocidal activities of Syringomycin and Syringotoxin and the characterization of isolates of *Pseudomonas syringae* from Citrus hosts.

Proceedings of the IV th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Vol. II: 643-650.

Sta. Path. Veg. Phytobact. INRA. Anger. Francia.

- 41) De Vay, J. E., Lukezic, F.L., Sinden, S. L., English, H. y Coplin, D.L. 1968.

A biocide produced by pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees.

Phytopathology. 58: 95-101.

- 42) Dickinson, C.H., Watson, J. Wallace, B. 1974.

An impression method for examining epiphytic micro-organisms and its application to phylloplane studies.

Trans. Br. Mycol. Soc. 63: 616-619.

- 43) Dye, D.W., Bradbury, J.F., Dickey, R.S., Goto, M.S., Hale, C.N., Hayward, A.C., Kelman, A., Lelliott, R.A., Patel P.N., Sands, D.C., Schroth, M.N., Watson, D.R.W. y Young J.M. 1975.

Proposals for a reappraisal of the status of names of plant-pathogenic *Pseudomonas* species.

Int. J. Sys. Bacteriol. 25: 252-257.

- 44) Dye, D.W., Bradbury, J.F., Goto. M.S., Hayward, A.C., Lelliott, R.A., y Schroth, M.N. 1980.

International standards for naming pathovars of
phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names
and pathotype strains.

Rev. Plant Pathol. 59: 153-168.

- 45) English, H. y Davis, J.R. 1960.
The source of inoculum for bacterial canker and blast
of stone fruit trees.
Phytopathology. 50 : 634.

- 46) Ercolani G.L. 1971.
Presenza epifitica di *Pseudomonas savastanoi* (E.F.
Smith) Stevens. sull'olivo in Puglia.
Phytopath. Medit. 10: 130-132.

- 47) Ercolani, G.L. 1979.
Distribuzione di *Pseudomonas savastanoi* sulle foglie
dell'olivo.
Phytopath. Medit. 18: 85-88.

- 48) Ercolani, G.L. 1982.
Variability in epiphytic populations of *Pseudomonas*
syringae pv. *savastanoi* from olive.
Proceedings of the V th. International Conference on
Plant Pathogenic Bacteria: 162-164.
Lozano, J. C. Ed.

- 49) Ercolani, G.L. 1983.
Variability among isolates of *Pseudomonas syringae* pv.
savastanoi from the phylloplane of the olive.

- J. Gen. Microbiol. 129: 901-916.
- 50) Ercolani, G.L. 1985.
Factor analysis of fluctuation in populations of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* on the phylloplane of the olive (*Olea europaea*).
Microbial Ecology. 11: 41-50.
- 51) Erikson, D. y Montgomery, H.B.S. 1945.
The action of cell-free filtrates of *Pseudomonas mors-prunorum*. Wornald and related phytopathogenic bacteria on plum trees.
Ann. Appl. Biol. 32: 117-123.
- 52) Esau, K. 1967.
Anatomia Vegetal: 171
Ediciones Omega S.A.
- 53) Evidence, A., Surico, G., Iacobellis, N.S. y Randazzo, G. 1986.
Alpha-N-acetyl-indole-3-acetyl-epsilon-L-lisine: a metabolite of indole-3-acetic acid from *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.
Phytochemistry. 25: 125-128.
- 54) Fackler, V., Reich, J. y Hock, B. 1986.
Auxin distribution in spruce needles.
J. Plant Physiol. 126: 163-172.
- 55) Ferraris, T. 1926.

Trattato di Patologia e Terapia Vegetale. 3ª Ed.
Hoepli. Milano.

- 56) Fett, W.F., Osman, S.F. y Dunn, M.F. 1987.
Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads.
Appl. Environ. Microbiol. 53: 1839-1845.
- 57) Fett, W.F. y Zacharius, R.M. 1983.
Bacterial growth and phytoalexin elicitation in soybean cell suspension cultures inoculated with *Pseudomonas syringae* pathovars.
Physiol. Plant Pathol. 22: 151-172.
- 58) Francesconi, F. 1952.
Sulla classificazione delle varietà di olivo.
Ann. Sperim. Agr. 1952: 711-737.
- 59) Frutos Borreguero, M. de 1986.
Tumores Vegetales de España. Fitomas-Agallas:88
C.S.I.C. Madrid.
- 60) Fytizas, E. 1970.
Action de quelques antibiotiques sur les adultes de *Dacus oleae* et leur descendance.
Z. Angew. Entomol. 65: 453-458.
- 61) Fytizas, E. y Tzanakakis, M.E. 1966.
Some effects of streptomycin, when added to the adult food, on the adults of *Dacus oleae* (Diptera:

Tephritidae) and their progeny.

Ann. Entomol. Soc. Am. 59: 269-273.

- 62) García Tabares, F. Herraiz-Tomico, T. Amat-Guerri, F. y García Bilbao, J.L. 1987.

Production of 3-indoleacetic acid and 3-indolelactic acid in *Azotobacter vinelandii* cultures supplemented with tryptophan.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 502-506.

- 63) Gardner, J.M. y Kado, C.I. 1977.

Studies on *Agrobacterium tumefaciens*. VI: DNA polymerases of crown-gall tumor and normal cells, and of the bacterium.

Physiol. Plant Pathol. 11: 79-86.

- 64) Gitatis, R.D., Sasser, M. J., Beaver, R.W., Mc Innes, T.B. y Stall, R.E. 1987.

Pectolytic xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants.

Phytopathology. 77: 611-615.

- 65) Glass, N.L. y Kosuge, T. 1985.

Molecular cloning of the gene for the synthesis of IAA-lysine from *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

J. Cell. Biochem. Supplement 0 n 9: 217.

- 66) Glass, N.L. y Kosuge, T. 1986.



- Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*.
J. Bacteriol. 166: 598-603.
- 67) Gnanamanickam, S.S. y Ward, E.W.B. 1982.
Characterization of *Pseudomonas syringae* strains causing disease symptoms on soybean.
Can. J. Plant Pathol. 4: 233-236.
- 68) González, C.F., De Vay, J.E. y Wakeman, R.J. 1981.
Syringotoxin, a phytotoxin unique to *Citrus* isolates of *Pseudomonas syringae*.
Physiol. Plant Pathol. 18: 41-50.
- 69) González, C.F., Layher, S.K., Vidaver, A.K. y Olsen, R.H. 1984.
Transfer, mapping and cloning of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* plasmid pCG 131 and assessment of its role in virulence.
Phytopathology. 74: 1245-1250.
- 70) González, C.F. y Vidaver, A.K. 1978.
Analysis of plasmids of syringomycin producing strains of *Pseudomonas syringae*.
Proceedings of the IV th. International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Vol. I: 31-38.
Sta. Path. Veg. Phytobact. INRA. Angers. Francia.
- 71) González, C.F. y Vidaver, A.K. 1979.

Syringomycin production and holcus spot disease of maize: plasmid associated properties in *Pseudomonas syringae*.

Curr. Microbiol. 2: 75-80.

- 72) González, C.F. y Vidaver, A.K. 1980.

Restriction enzyme analysis of plasmids from Syringomycin-producing strains of *Pseudomonas syringae*.

Phytopathology. 70: 223-225.

- 73) Gordon, S.A. y Weber, R.P. 1951.

Colometric estimation of indoleacetic acid.

Plant Physiol. 26: 192-195.

- 74) Gorlenko, M.V. 1965.

Bacterial Diseases of Plants: 20-103.

Israel Program for Scientific Translations.

- 75) Graniti, A. y Laviola, C. 1981.

Sguardo generale alle malattie parassitarie dell'olivo.

Informatore Fitopatologico. 31: 77-92.

- 76) Griffin, C.W., Carski, T.R. y Warner, G.S. 1961.

Labeling procedures employing crystalline fluorescein isothiocyanate.

J. Bacteriol. 82: 534.

- 77) Gross, D.C. 1985.

Regulation of Syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production.

J. Appl. Bacteriol 58: 167-174.

- 78) Gross, D.C., Cody Y.S., Proebsting Jr., E.L., Radamaker, G.K. y Spotts, R.A. 1984.
Ecotypes y pathogenicity of ice-nucleation-active *Pseudomonas syringae* isolates from deciduous fruit tree orchards.
Phytopathology. 74: 241-248.
- 79) Gross, D.C. y De Vay, J.E. 1976.
Syringotoxin: A toxigenic peptide produced by *Pseudomonas syringae*.
Proceedings of the American Phytopathological Society. 3: 269-270.
- 80) Gross, D.C. y De Vay, J.E. 1977.
Population dynamics and pathogenesis of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to the in vitro production of Syringomycin.
Phytopathology. 67: 475-483.
- 81) Gross, D.C. y De Vay, J.E. 1977.
Production and purification of Syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*.
Physiol. Plant Pathol. 11: 13-28.
- 82) Gross, D.C. y De Vay, J.E. 1977 c.

Role of Syringomycin in holcus spot of maize and systemic necrosis of cowpea caused by *Pseudomonas syringae*.

Physiol. Plant. Pathol. 11: 1-11.

- 83) Gross, D.C., De Vay, J.E. y Stadtman, F.H. 1977 d.
Chemical properties of Syringomycin and Syringotoxin: toxigenic peptides produced by *Pseudomonas syringae*.
J. Appl. Bacteriol. 43: 453-463.
- 84) Gross, D.C. y Vidaver, A.K. 1981.
Transformation of *Pseudomonas syringae* with non conjugative R plasmids.
Can. J. Microbiol. 27: 759-765.
- 85) Guinn, G., Brummet, D.L. y Beier, R.C. 1986.
Purification and measurement of Abscissic Acid and Indoleacetic Acid by High Performance Liquid Chromatography.
Plant Physiol. 81: 997-1102.
- 86) Hagen, K.S. 1966.
Dependence of the olive fly, *Dacus oleae*, larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive.
Nature. 209: 423-424.
- 87) Hedrick, H.G. 1956.
Exudates produced by phytopathogenic bacteria.
Phytopathology. 46: 14-15.

- 88) Hellmuth, H. 1956.
Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden
(Diptera).
Z. Morphol. Oekol. Tiere. 44: 483-517.
- 89) Heredia, A., Sánchez-Roldán, C. y Valpuesta, V. 1986.
Método fluorimétrico cinético para la determinación
del Acido Indol-3-Acético en tejidos vegetales.
XIII Congreso Nacional de Bioquímica. Zaragoza: 232.
- 90) Herrero García, M. 1950.
El olivo a través de las letras españolas. Ensayo
antológico: 13.
Sindicato Nacional del Olivo. Madrid.
- 91) Hirano, S.S., Baker, L.S. y Upper, C.D. 1985.
Ice nucleation temperature of individual leaves in
relation to population sizes of ice nucleation active
bacteria and frost injury.
Plant Physiol. 77: 259-265.
- 92) Hirano, S.S., Rouse, D.I. y Upper, C.D. 1987.
Bacterial ice nucleation as a predictor of bacterial
brown spot disease on snap beans.
Phytopathology. 77: 1078-1084.
- 93) Hirano, S.S. y Upper, C.D. 1983.
Ecology and epidemiology of foliar bacterial pathogens.
Ann. Rev. Phytopathol. 21: 243-269.

- 94) Hirano, S.S. y Upper, C.D. 1985.
Ecology and physiology of *Pseudomonas syringae*.
Bio Technology. 3: 1073-1078.
- 95) Hunter, W.J. 1987.
Influence of 5 - methyltryptophan - resistant
Bradyrhizobium japonicum on soybean root nodule indole
-3-acetic acid content.
Appl. Environ. Microbiol. 53: 1051-1055.
- 96) Hutcheson, S.W. y Kosuge, T. 1985.
Regulation of 3 - indoleacetic acid production in
Pseudomonas syringae pv. *savastanoi*. Purification and
properties of tryptophan - 2 - monooxygenase.
J. Biol. Chem. 260: 6281-6287.
- 97) Hutzinger, O. y Kosuge, T. 1968.
Microbial synthesis and degradation of indole - 3 -
acetic acid. III. The isolation and characterization
of indole - 3 - acetyl - Σ - L - lysine from culture
filtrates of *Pseudomonas savastanoi*.
Biochemistry. 7: 601-605.
- 98) Jackson, D.L. y Mc Wha, J.A. 1983.
Rapid breakdown of indole - 3 - acetic acid on
silicagel thin-layer plates.
J. Chromatogr. 267: 242-245.
- 99) Janse, J.D. 1981.
The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*)

- caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. I. History, occurrence and symptoms.
Eur. J. For. Pathol. 11: 306-315.
- 100) Janse, J. D. 1981 b.
The Bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*) caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology and taxonomic considerations.
Eur. J. For. Path. 11: 425-438.
- 101) Janse, J.D. 1982.
Pseudomonas syringae subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on Oleaceae and *Nerium oleander* L.
Int. J.Syst. Bacteriol. 32: 166-169.
- 102) Jensen, W. H. 1962
Botanical Histochemistry. 78-83
Freeman and Co.
- 103) Jones, J. B., Mc Carter, S.M. y Gitatis, R.D. 1981.
Association of *Pseudomonas syringae* var. *syringae* with a leaf spot disease of tomato. *Lycopersicum esculentum* cultivar Chico III,. transplants in Southern Georgia U.S.A.
Phytopathology. 71: 1281-1285.
- 104) Jordan, D.C. 1984
Family III. Rhizobiaceae. En Krieg, N. R. y Hott, J.G.
Ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1: 234

Williams & Wilkins. Baltimore-London.

- 105) Kado, C.I. y Heskett, M.G. 1970
 Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
Corynebacterium, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*.
Phytopathology. 60: 969-976.

- 106) Kersters, K. y De Ley, J. 1984.
 Genus III. *Agrobacterium*. En Krieg, N. R. y Hott, J.G..
 Ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1: 251.
 Williams & Wilkins. Baltimore-London.

- 107) Killander, J., Bonten, J. y Roden, L. 1961.
 Rapid preparation of fluorescent antibodies using gel-
 filtration.
Nature. 192: 182.

- 108) King, E.O. Ward, M.K. y Raney, D.E. 1954.
 Two simple media for the demonstration of pyocyanin and
 fluorescin.
J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.

- 109) Kinsky, S. C. 1962.
 Alterations in the permeability of *Neurospora crassa*
 due to polyene antibiotics.
J. Bacteriol. 82: 889-897.

- 110) Klement, Z, Farkas, G.L. y Lovrekovich, L. 1964.
 Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic
 bacteria in the tobacco leaf.

- Phytopathology. 54: 474-477.
- 111) Klement, Z., Rozsnyay, D.S. Balo, E. Panczel, M. y Prileszky. 1984.
The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae*.
Physiol. Plant Pathol. 24: 237-246.
- 112) Klinge, K. 1960.
Differentiation techniques and methods of isolation of *Pseudomonas*.
J. Appl. Bacteriol. 23: 442-462.
- 113) Kosuge, T., Heskett, M.G. y Wilson, E.E. 1966.
Microbial synthesis and degradation of indole - 3 - acetic acid. I. The conversion of L - tryptophan to indole - 3 - acetamide by an enzyme from *Pseudomonas savastanoi*.
J. Biol. Chem. 241: 3788-3744.
- 114) Kosuge, T., Palm, C.J., Hutcheson, S.V., Louise, N., Glass, E. y Yamada T. 1985.
pIAA, a virulence plasmid in *Pseudomonas savastanoi*.
Basic Life Sci. 30: 807-813.
- 115) Kovacs, N. 1956.
Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction.
Nature. 178: 703.

- 116) Kozloff, L.M., Lute, M. y Westaway, D. 1984.
Phosphatidylinositol as a component of the Ice
Nucleating Site of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia*
herbicola.
Science. 226: 845-846.
- 117) Larpent, J.P., Larpent-Gourgaud, M. 1970.
Microbiologie Pratique. Herman. Paris.
- 118) Lavermicola, P. y Surico, G. 1987 a.
Presenza epifitica di *Pseudomonas syringae* pv.
savastanoi e di altri batteri sull'olivo e
sull'oleandro.
Phytopath. medit. 26: 136-141.
- 119) Lavermicola, P., Surico, G., Varvaro, L., Babelegoto,
N.M. 1987 b.
Attività fitormonica, criogena e antimicrobica dei
batteri epifiti dell'olivo e dell'oleandro.
Phytopath. medit. 26: 65-72.
- 120) Leben, C. 1965.
Epiphytic microorganisms in relation to plant disease.
Annu. Rev. Phytopathol. 3: 209-230.
- 121) Lelliot, R.A., Billing, E. y Hayward, A.C. 1966.
A determinative scheme for the fluorescent plant
pathogenic pseudomonads.
J. Appl. Bacteriol. 29: 470-489.
- 122) Lelliot, R.A. y Dickey, R.S. 1984.

Genus VII. *Erwinia*. En Krieg, N. R. y Hott, J. G.
Ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1: 469
Williams & Wilkins. Baltimore-London.

- 123) Lindemann, J., Arny, D.C. y Upper, C.D. 1984.
Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv.
syringae on snap bean and nonhost plants and the
incidence of bacterial brown spot disease relation to
cropping patterns.
Phytopathology. 74: 1329-1333.
- 124) Lindow, S.E. 1983.
The role of bacterial ice nuclei in frost injury to
plants.
Ann. Rev. Phytopathol. 21 : 363-384.
- 125) Lindow, S.E., Arny, D.C. y Upper, C.D. 1978.
Distribution of ice nucleation - active bacteria on
plants in nature.
Appl. Environ. Microbiol. 36: 831-838.
- 126) Lindow, S.E., Arny, D.C., Upper, C.D. y Barchet, W.R.
1978 b.
The role of bacterial ice nuclei in frost injury to
sensitive plants. En Li, P.H. y Sakai, A. Ed. Plant Cold
Hardiness and Freezing Stress-Mechanisms and Crop
Implications: 249-263.
Academic Press. New York.
- 127) Lindow, S.E., Hirano, S.S., Barchet, W.R. Arby D.C. y

- Upper, C.D. 1982.
Relationship between ice nucleation frequency of
bacteria and frost injury.
Plant Physiol. 70: 1090-1093.
- 123) Loper, J.E. y Schroth, M.N. 1986.
Influence of bacterial sources of indole - 3 - acetic
acid on root elongation of sugar beet.
Phytopathology. 76: 386-389.
- 129) Loussert, R. y Brousse, G. 1980.
El olivo: 377-379.
Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- 130) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. y Randall, R.J.
1951.
Protein measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265.
- 131) Lysenko, O 1961.
Pseudomonas. An attempt at a general classification .
J. Gen. Microbiol. 25: 379-408.
- 132) McFaddin. 1980.
Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias
de importancia clínica.
Panamericana. Buenos Aires.
- 133) Mc Guire, R.G. y Kosuge, T. 1979.
Biological properties and plasmids of olive and oleander

strains of *Pseudomonas savastanoi*.

Phytopathology 69: 917-918.

- 134) Magie, A.R., Wilson, E.E. y Kosuge T. 1963.
Indolacetamide as an intermediate in the synthesis of
indoleacetic acid in *Pseudomonas savastanoi*.
Science. 141: 1281-1282.
- 135) Majcherczyk, A. Rakoczy, L. y Hüttermann, A. 1986.
Improvements in methods for determination of abscisic
acid and indole - 3 - acetic acid by High Performance
Liquid Chromatography.
J. Chromatogr. 357: 399-408.
- 136) Maki, L.R., Galyan, E.L., Chang-chien, M. y Caldwell,
D.R. 1974.
Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*.
Appl. Microbiol. 28: 456-459.
- 137) Masoliver, F. 1973.
Tratamientos del olivo. Guía práctica.
Dilagro Ediciones. Lérida.
- 138) Mateo-Sagasta, E. 1975.
Enfermedades del olivo.
II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba. Vol. I.
Ponencias: 128-134. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- 139) Matthews, R.E.F. 1984.
Clasificación y Nomenclatura de los Virus: 151 y 178.

Grupo de Virologia de la S.E.M. Madrid.

- 140) Metcalfe, C.R. y Chalk, L. 1972.
Anatomy of the Dicotyledons. Vol.II Oleaceae: 893-900
Oxford University Press. Ely House. London.
- 141) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1986.
Anuario de Estadística Agraria 1985.
Servicio de Publicaciones del MAPA. Madrid.
- 142) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1983.
La Mosca del olivo.
Servicio de Publicaciones del M.A.P.A. Madrid.
- 143) Misaghi, I. y Grogan, R.G. 1969.
Nutritional and biochemical comparisons of plant-
pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads.
Phytopathology. 59: 1436-1450.
- 144) Mitchell, R.E., Hale, C.N. y Shanks, J.C. 1983.
Production of different pathogenic symptoms and
different toxins by strains of *Pseudomonas syringae* pv.
tomato not distinguishable by gel-immunodiffusion assay.
Physiol. Plant. Pathol. 23: 315-322.
- 145) Mitchell, R.E. y Johnston, J.S. 1983.
Toxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*:
correlation between production of toxin and strain host.
J. Gen Microbiol. 129: 1243-1246.
- 146) Morris, R.O. 1986.

Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens.

Ann. Rev. Plant. Physiol. 37: 509-538.

- 147) Morris, R.O. Powell, G.K., Beaty, J.S., Durley, R.C. y Hommes, N.G. 1986.

Cytokinin biosynthetic genes and enzymes from *Agrobacterium tumefaciens* and other plant-associated prokaryotes. En Bopp, M. Ed. Plant Growth Substances. Springer-Verlag. Berlin.

- 148) Orser C.S., Staskawicz, J.B., Loper, J. Panapoulos, N.J., Dahlbeck, D., Lindow, S.E. y Schroth, M.N. 1983.

Cloning of genes involved in bacterial ice nucleation and fluorescent pigment/siderophore production. En Puhler, A. Ed. Genetics of Plant Bacterial Interactions. Elsevier. North Holland Biomedical.

- 149) Orser, C.S., Staskawicz, J.B., Panopoulos, N.J., Dahlbeck, D. y Lindow, S.E. 1982.

Cloning and expression of ice nucleation genes from *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola* in *Escherichia coli*.
Phytopathology 72: 100.

- 150) Ortega-Nieto, J.M. 1955.

Las Variedades del Olivo Cultivadas en España.
Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas.

Ministerio de Agricultura. Madrid.

- 151) Osman, W.A., Tarabeih, A.M. y Michail, S.H. 1980.
Studies on olive knot disease in Iraq with reference
to response of different cultivars.
Mesopotamia Journal of Agriculture. 15: 245-261.
- 152) Osman, W.A., Tarabeih, A.M. y Michael, S.H. 1980.
Studies on the distribution of olive knot disease
induced by *Pseudomonas savastanoi* in Iraq.
Mesopotamia Journal of Agriculture. 15: 235-243.
- 153) Otta, J.D. y English, H. 1971.
Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*.
Phytopathology 61: 443-452.
- 154) Painter, V.A. y Alconero, R. 1979.
A specific fluorescent antibody for detection of
Syringomycin in infected peach tree tissues.
Phytopathology. 69: 493-496.
- 155) Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. y
Doudoroff, M. 1973.
Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*.
Inst. J. Syst. Bacteriol. 23: 333-339.
- 156) Pasinetti, L. 1953.
Malattie delle Piante: 712-733.
Ulrico Hoepli. Milano.
- 157) Patil, S.I. 1974.

Toxins produced by phytopathogenic bacteria.

Ann. Rev. Phytopathol. 12: 259-279.

- 158) Pauly, M.H., Shane, W.W. y Gengenbach, B.G. 1987.
Selection for bacterial blight phytoxin resistance in
wheat tissue culture.
Crop Science. 27: 340-344.
- 159) Pencé, V.C. y Caruso, J.L. 1987.
ELISA determination of IAA using antibodies against ring
-linked indoleacetic acid.
Phytochemistry. 26: 1251-1256.
- 160) Penner, D., De Vay, J.E. y Backman. 1969.
Influence of syringomycin on ribonucleic acid
synthesis.
Plant Physiol. 44: 806-808.
- 161) Piwowarski, J.M. y Sahw, P.D. 1982.
Characterization of plasmids from plant pathogenic
pseudomonads.
Plasmid. 7: 85094.
- 162) Puerta, C de la, Borrero, L. y Flores, V. 1972.
El Olivar Español: 13-14, 76, 97-98.
Dirección General de la Producción Agraria. Ministerio
de Agricultura. Madrid.
- 163) Rallo-Romero, L. y Cidraes, F. 1975.
Mejora Vegetal del Olivo.

II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba. Vol. I.
 Ponencias: 28.
 Ministerio de Agricultura. Madrid.

- 164) Reidl, H.H. y Takemoto, J.Y. 1987.
 Mechanism of action of bacterial phytotoxin,
 syringomycin. Simultaneous measurement of early
 responses in yeast and maize.
 Biochim. Biophys. Acta. 898: 59-69.
- 165) Reynolds, E.S. 1963.
 The use of lead citrate at high pH as an electron-
 opaque stain in electron microscopy.
 J. Cell Biol. 17: 208-212.
- 166) Roos, I.M.M. y Hattinhg, M.J. 1983.
 Scannig Electron Microscopy of *Pseudomonas syringae* pv.
morsprunorum on sweet cherry leaves.
 Phytopath. Z. 108: 18-25.
- 167) Roos, I.M.M. y Hattingh, M.J. 1987.
 Pathogenicity and numerical analysis of phenotypic
 features of *Pseudomonas syringae* strains isolated from
 deciduous fruit trees.
 Phytopathology. 77: 900-908.
- 168) Ruiz Castro, A. 1948.
 Fauna Entomológica del Olivo en España. Estudio
 Sistemático-Biológico de las Especies de Mayor
 Importancia Económica. Vol. I: Generalidades, Coleoptera

y Diptera.

Instituto Español de Entomología. C.S.I.C. Madrid.

- 169) Ruiz Castro, A. 1951.

Fauna Entomológica del Olivo en España. Vol. II:
Hemiptera, Lepidoptera y Thysanoptera.

Instituto Español de Entomología. C.S.I.C. Madrid.

- 170) Sakai, R. 1980.

Comparison of physiological activities between
coronatine and indole - 3 - acetic acid to some plant
tissues.

Annals of the Phytopathological Society of Japan. 46:
499-503.

- 171) Sands, D.C., Schroth, M.N. y Hildebrand, D.C. 1970.

Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads.

J. Bacteriol. 101: 9-23.

- 172) Sands, D.C., Schroth, M.N. y Hildebrand, D.C. 1980.

Pseudomonas. En Schaad. Ed. Laboratory Guide for
Identification of Plant Pathogenic Bacteria: 36-44.

American Phytopathological Society. St. Paul. Minn.
U.S.A.

- 173) Santaolalla, M. y Cañas, L. 1983.

El lipopolisacárido de *Pseudomonas savastanoi*.

Microbiol. Esp. 36: 65-74.

- 174) Savastano, G. 1939.

Identificazione delle varietà di olivo.

Annali della Stazione Sperimentale di Olivicoltura di
Pescara. VI: 99-114.

- 175) Savastano, L. 1886.

Les maladies de l'olivier: hiperplasies et tumeurs.
Compt. Rend. Acad. Agr. France. 103: 1278.

- 176) Scaramuzzi, F. 1950.

Sobre la descripción y clasificación de las variedades
de olivo en cultivo.
XIII Congreso Internacional de Oleicultura. Madrid-
Sevilla. Actas de Oleicultura II: 68-74.

- 177) Schnell, R.C. y Vali, G. 1972.

Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation.
Nature. 236: 163-165.

- 178) Schlegel, H.G. 1975.

Microbiología General. 228-233
Ediciones Omega. Barcelona.

- 179) Schneider, R.W. y Grogan, R.G. 1972.

Bacterial speck of tomato: Sources of inoculum and
establishment of a resident population.
Phytopathology. 67: 388-394.

- 180) Schroth, M.N. y Hildebrand, D.C. 1968.

A chemotherapeutic treatment for selective y
erradicating crown gall and olive knot neoplasms.

- Phytopathology. 58: 848-854.
- 181) Schroth, M.N., Osgood, J.W. y Miller, T.D. 1973.
Quantitative assessment of the effect of the olive knot
disease on olive yield and quality.
Phytopathology. 63: 1064-1065.
- 182) Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. y Starr, M.P. 1981.
Phytopathogenic members of the genus *Pseudomonas*. En
Starr y Stolp. Ed. The Prokaryotes. A handbook on
habitats, isolation and identification of the bacteria:
701- 718.
Springer-Verlag. Berlin.
- 183) Schuster, M.L. y Coyne, D.P. 1974.
Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria.
Ann. Rev. Phytopathol. 12: 199-221.
- 184) Seemueller, E. 1980.
Population dynamics of *Pseudomonas syringae* on sour
cherry and the toxicity of syringomycin to leaves and
isolated leaf cells.
J. Plant. Dis. Prot. 87: 51-61.
- 185) Sinden, S.L. y De Vay, J.E. 1967.
The nature of the wide-spectrum antibiotic produced by
pathogenic strains of *Pseudomonas syringae* and its role
in the bacterial canker disease of *Prunus persicae*.
Phytopathology. 57: 102.

- 186) Sinden, S.L., De Vay, J.E. y Backman, P.A. 1971.
Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*, and its role in the bacterial canker disease of peach trees.
Physiol. Plant Pathol. 1: 199-213.
- 187) Smidt, M. y Kosuge, T. 1978.
The role of indole - 3 - acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders.
Physiol. Plant Pathol. 13: 203-214.
- 188) Smith, E.F. 1908.
Recent studies of the olive-tubercle organism.
Bull. U.S. Dept. Agr, Bur. Plant. Ind. 131: 25-43.
- 189) Smith, E.F. 1920.
An introduction to bacterial diseases of plants: 389-412.
W.B. Saunders Co. Philadelphia-London.
- 190) Sprang, M.L. y Lindow, S.E. 1981.
Subcellular localization and partial characterization of ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*.
Phytopathology. 71: 256.
- 191) Spurr, A.R. 1969.
A low epoxy resin embedding medium for electron microscopy.

J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43

- 192) Süle, S. y Seemüller, E. 1987.
The role of ice formation in the infection of sour
cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.
Phytopathology. 77: 173-177.
- 193) Surico, G. 1977.
Osservazioni istologiche sui tubercoli della "rogna"
dell'olivo.
Phytopath. Medit 16: 109-125.
- 194) Surico, G. 1985 b.
IAA and cytokinins in the olive knot disease. An overview
of their role and their genetic determinants. En Bailey,
J.A. Ed. NATO ASI Series. H.: Cell Biology. Vol. 1
Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen
Interactions: 315-330.
Springer-Verlag. Berlin-New York.
- 195) Surico, G. Comai, L. y Kosuge, T. 1984.
Pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv.
savastanoi and their indoleacetic acid-deficient mutants
on olive and oleander.
Phytopathology. 74: 490-493.
- 196) Surico, G. y De Vay, J.E. 1982.
Effect of syringomycin and syringotoxin produced by
Pseudomonas syringae pv. *syringae* on structure and
function of mitochondria isolated from holcus spot

resistant and susceptible maize lines.

Physiol. Plant Pathol. 21: 39-53.

- 197) Surico, G., Evidence, A., Iacobellis, N.S. y Randazzo, G. 1985 a.

A cytokinin from the culture filtrate of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

Phytochemistry. 24: 1499-1502.

- 198) Surico, G. y Iacobellis, N.S. 1977.

Confronto di alcuni indici di virulenza di isolati di *Pseudomonas syringae*. Van Hall da fagiolo.

Phytopath. Medit. 16: 79-86.

- 199) Surico, G., Iacobellis, N.S. y Sisto, A. 1985 c.

Studies on the role of indole - 3 - acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

Physiol. Plant Pathol. 26: 309-320.

- 200) Surico, G. y Minafra, A. 1985.

Physiological and pathological characteristics of *Pseudomonas syringae*. Van Hall pv. *syringae* in relation to toxin production.

Phytopath. Medit. 24: 304-306.

- 201) Surico, G., Sparapano, L., Lerario, P., Durbin, R.O. y Iacobellis, N. 1975.

Cytokinin - like activity in extracts from culture filtrates of *Pseudomonas savastanoi*.

Experientia 31: 929-930.

- 202) Theologis, A. 1986.
Rapid gene regulation by auxin.
Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 407-438.
- 203) Thirumalachar, M.J. 1968.
Antibiotics in the control of plant pathogens.
Adv. Appl. Microbiol 10: 313-335.
- 204) Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M.,
Valentine, D.H., Walters, S.M. y Webb, D.A. 1972.
Flora Europaea. Vol. 3. Diapensiaceae to Myoporaceae:
52-55.
Cambridge University Press. Cambridge.
- 205) Vali, G. 1971.
Quantitative evaluation of experimental results on the
heterogeneous freezing nucleation of supercooled
liquids.
J. Atmos. Sci. 28: 402-409.
- 206) Vanderhoef, L.N. y Dute, R.R. 1981.
Auxin-regulated wall loosening and sustained growth in
elongation.
Plant Physiol. 67: 146-149.
- 207) Varvaro, L. 1983 a.
Influenza della temperatura sulla moltiplicazione di
Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* (Smith) Young et al.

Phytopath. Medit. 22: 39-46.

- 208) Varvaro, L. 1983 b.

Un substrato selettivo per *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

Phytopath. Medit. 22: 78-79.

- 209) Varvaro, L. y Ferrulli, M. 1983.

Sopravvivenza di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smith) Young et al sulle foglie di due varietà di olivo (*Olea europaea* L.)

Phytopath. Medit. 22: 1-4

- 210) Varvaro, L. y Surico, G. 1978.

Comportamento di diverse cultivars di olivo (*Olea europaea* L.) alla inoculazione artificiale con *Pseudomonas savastanoi* (E.F. Smith) Stevens.

Phytopath. Medit. 17: 174-178.

- 211) Varvaro, L. y Surico G. 1978.

Moltiplicazione di *Pseudomonas savastanoi* (E.F. Smith) Stevens. nei tessuti dell'olivo (*Olea europaea* L.).

Phytopath. Medit. 17: 178-186.

- 212) Varvaro, L. y Surico G. 1981

Titolazione dell'infettività di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. (Smith). Young et al. su alcune cultivar di olivo. (*Olea europaea* L.).

Phytopath. Medit. 20: 72-78.

- 213) Vidaver, A.K. y Buckner, S. 1978.
Typing of fluorescent phytopathogenic pseudomonads by
bacteriocin production.
Can. J. Microbiol. 24: 14-18.
- 214) Vine, J.H., Noiton, D., Plummer, J.A., Baleriola-Lucas,
C. y Mullins, M.G. 1987.
Simultaneous quantitation of indole - 3 - acetic acid
and abscisic acid by Gas Chromatography/Mass
Spectrometry/Selected Ion Monitoring.
Plant Physiol. 85: 419-422.
- 215) Wakimoto, T. 1977.
Biologically active substances produced by
phytopathogenic bacteria.
J. Pestic. Sci. 2: 495-504.
- 216) Wilson, E.E. 1935.
The olive knot disease, its inception, development, and
control.
Hilgardia 9: 233-264.
- 217) Wilson, E.E. 1965.
Pathological histogenesis in oleander tumors induced by
Pseudomonas savastanoi.
Phytopathology. 55: 1244-1249.
- 218) Wood, R.K.S. 1972.
Phytotoxins in Plant Diseases.
Proceedings of the NATO ASI. Pugnuchiuso. Italia.

Academic Press. London-New York.

- 219) Yamada, T., Loe, P.D. y Kosuge, T. 1986.
Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*
nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium*
tumefaciens transfer DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 8263-8271.
- 220) Yamada, T., Palm, C.J., Brooks B. y Kosuge, T. 1985.
Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi*
indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium*
tumefaciens Ti-DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 6522-6526.
- 221) Yoder, O.C. 1980.
Toxins in pathogenesis.
Ann. Rev. Phytopathol. 18: 103-129.
- 222) Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos,
C.G. y Robbs, C.F. 1978.
A proposed nomenclature and classification for plant
pathogenic bacteria.
N.Z. J. Agric. Res. 21: 153-177.
- 223) Zhang, L. y Takemoto, J. Y. 1986.
Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin,
syringomycin. Interaction with the plasma membrane of
wild-type and respiratory-deficient strains of
Saccharomyces cerevisiae.
Biochim. Biophys. Acta. 861: 201-204.

- 224) Zang, L. y Takemoto, J. Y. 1987.
 Effets of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin,
 on plasma mebrane functions of *Rhodotorula pilimanae*.
 Phytopathology. 77: 297-303.